

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Doctorado en Biomedicina y Farmacia
Departamento de Farmacia y
Tecnología Farmacéutica y Parasitología



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE MÉTODOS DE DISOLUCIÓN CON
CAPACIDAD PREDICTIVA DEL RENDIMIENTO *IN VIVO* DE
FORMULACIONES FARMACÉUTICAS**

Autor:

ANDRÉS IGNACIO FIGUEROA CAMPOS

Directores:

**MARTA GONZALEZ ALVAREZ
VIRGINIA MERINO SANJUÁN
MARIA DEL VAL BERMEJO SANZ**

**VALENCIA
Febrero 2019**



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología

Los que suscriben, **Dra. Virginia Merino Sanjuán** del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universidad de Valencia, **Dra. M^a del Val Bermejo Sanz**, y **Dra. Marta González Álvarez**, del Departamento de Ingeniería, Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Miguel Hernández de Elche

CERTIFICAN:

Que la Memoria de Tesis Doctoral realizada por Andrés Ignacio Figueroa Campos y que lleva por título “DESARROLLO DE MÉTODOS DE DISOLUCIÓN CON CAPACIDAD PREDICTIVA DEL RENDIMIENTO IN VIVO DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS”, ha sido realizado bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscriben en Valencia, 22 de Febrero de 2019



Fdo. Dr. Virginia Merino



Fdo. Dra. Marta González



Fdo. Dra. M^a del Val Bermejo

AGRADECIMIENTOS

Marival, infinitas gracias por darme la oportunidad de realizar este proyecto contigo junto a Virginia, Marta e Isabel. Las enseñanzas y conversaciones, sus palabras, siempre serán mi ejemplo.

Nacho, Mayte, Alejandro, Verónica, Isa L, Estela, Víctor, Adrian y Tere, compañeros del maravilloso Dream Team. Donde compartimos hermosos, divertidos y gratos momentos.

Mari Lisa y Javi, una historia diferente se hubiera escrito sin sus amistades, gracias por siempre apoyarme, ayudarme y cuidarme.

Sarin, desde el momento de mi llegada fuiste una súper compañera, formamos un excelente equipo. Eres una gran persona, Mi Amiga.

Al Instituto de Salud Pública de Chile, por darme las facilidades para realizar estos estudios de post grado.

A Regina Pezoa Reyes, Alexis Aceituno Álvarez y Nella Gai Hernández por confiar en mí desde el comienzo.

No puedo olvidar a mis compañeras (os) del Instituto de Salud Pública de Chile, compañeros de colegio, amistades de la vida, gracias a cada uno por ayudarme a ser una persona feliz.

A Gisela Riesle por tu apoyo, amor y energía que me entregaste desde el primer momento, día a día. Te Amo Novia.

A Isidora y Sebastián, mis queridos sobrinos, por iluminar la familia. Andrea, hermana querida, sin ti esto no hubiese sido posible, gracias por todo. Sergio, papá, amigo, por todo el gran trabajo que haces siempre junto a Norma, querida mamá, que por cosas de la vida no te encuentras en tu 100%, esto es para ti, vuestro trabajo.

RESUMEN

Los estudios de bioequivalencia han permitido el desarrollo de medicamentos genéricos como una vía sustentable para el acceso a medicamentos seguros, eficaces y de calidad. El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, que estableció los factores que determinan la absorción de fármacos por vía oral, ha promovido la investigación de metodologías alternas a los estudios de bioequivalencia en humanos, permitiendo asegurar la equivalencia terapéutica de formas farmacéuticas sólidas de uso oral, con grandes beneficios desde el punto de vista económico y ético.

La presente investigación tiene por objetivo desarrollar metodologías *in vitro* e *in situ* que permitan predecir el desempeño *in vivo* de formas farmacéuticas que contienen fármacos de la clase 2 del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico. Se estudiaron formulaciones sólidas orales de liberación inmediata de candesartán cilexetilo, valsartán y clonazepam; de las que se disponía de datos de los estudios de bioequivalencia en humanos que no cumplían a cabalidad con los criterios para ser consideradas bioequivalentes con respecto al producto de referencia.

Para el diseño experimental se realizaron estudios de solubilidad de los fármacos y de velocidad de disolución de las formulaciones empleando distintos medios y aparatos de disolución. Se determinó la permeabilidad *in situ* de los fármacos y estudió el efecto de los excipientes sobre la solubilidad y permeabilidad de los fármacos.

Los estudios experimentales de solubilidad y permeabilidad en el modelo *in situ* permitieron clasificar como clase 2 a candesartán cilexetilo y clonazepam y como clase 4 a Valsartán.

Los estudios de velocidad de disolución en el aparato II con los medios empleados para bioexenciones no resultaron predictivos de lo que sucede *in vivo*. El aparato IV con los medios a pH 1,2; 4,5 y 6,8 con Tween 20 al 0,2% permite una correlación *in vivo-in vitro* tipo A para las formulaciones de candesartán cilexetilo estudiadas y ese mismo modelo, de forma preliminar, muestra una aproximación al desempeño *in vivo* de las formulaciones de clonazepam.

A la luz de los resultados experimentales, se observa que algunos excipientes afectan la solubilidad de los fármacos estudiados. Así, el almidón provoca una disminución de la solubilidad de candesartán cilexetilo y clonazepam. Candesartán cilexetilo y valsartán muestran menos solubilidad frente a talco y macrogol. La solubilidad de candesartán cilexetilo se ve disminuida además por lactosa, hidroximetilcelulosa y estearato de magnesio. Valsartán presenta una mayor solubilidad en presencia de estearato de magnesio, celulosa microcristalina e hidroximetilcelulosa y una menor solubilidad frente a crospovidona, óxido de titanio y silicio. Clonazepam disminuye su solubilidad cuando está presente la celulosa microcristalina.

La permeabilidad de candesartán cilexetilo disminuye en presencia de hidroxipropilcelulosa, almidón, estearato de magnesio y talco que puede deberse a un aumento en la viscosidad del medio provocada por estos excipientes, lo que interfiere con la difusión de las moléculas de fármaco en la membrana; o a un efecto directo de los excipientes sobre la bicapa lipídica de mecanismo desconocido que provoca un incremento en su resistencia a la difusión de solutos o a una disminución del coeficiente de reparto aparente del fármaco en la membrana. Valsartán y clonazepam no muestran cambios en la permeabilidad frente a los excipientes estudiados.

ABREVIATURAS

EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
OMS	Organización Mundial de la Salud
BPM	Buenas prácticas de manufactura
FFSOLI	Forma farmacéutica sólida oral de liberación inmediata
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
CIVIV	Correlación <i>in vivo</i> – <i>in vitro</i>
ABC	Área bajo la curva
C _{máx}	Concentración máxima
T _{máx}	Tiempo máximo
CV	Coeficiente de variación
DE	Desviación estándar
R ²	Coeficiente de determinación
LSS	Lauril sulfato de sodio
BE	Bioequivalencia
F ₂	Factor de similitud
FaSSIF	Fluido intestinal simulado en estado de ayunas
FeSSIF	Fluido intestinal simulado en estado alimentado
FaSSGF	Fluido gástrico simulado en estado de ayunas
BPL	Buenas practicas de laboratorio
K _a (h ⁻¹)	Constante de asociación
IC	Intervalo de confianza
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT

RESUMEN

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	12
1. Desarrollo de genéricos. Bioequivalencia y su marco regulatorio	12
2. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico	15
2.1. Bioexenciones basadas en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico	19
3. Estudios de Solubilidad. Modelos experimentales.....	21
3.1. Método de agitación del matraz	22
3.2. Método de titulación potenciométrica	23
3.3. Método turbidimétrico	23
3.4. Método <i>in silico</i> para predecir la solubilidad	24
3.5. Estudios de Solubilidad. Efecto de excipientes	25
4. Estudios de Permeabilidad. Modelos experimentales.....	27
4.1. Estudios de permeabilidad en humanos	27
4.2. Estudios de permeabilidad en modelos animales <i>in situ</i>	28
4.3. Estudios de permeabilidad en modelos <i>in vitro</i>	29
4.4. Métodos preliminares e <i>in silico</i> para predecir la permeabilidad	30
4.5. Efecto de los excipientes sobre la absorción de fármacos.....	32
5. Ensayos de Disolución.....	37
5.1. Aparatos de disolución I y II	40
5.2. Aparato de disolución IV	43
5.3. Medios de disolución.....	44
5.3.1. Medios de disolución establecidos en las Farmacopeas.....	47
5.3.2. Medios biopredictivos	48
6. Correlaciones <i>In Vivo-In Vitro</i>	55
7. Fármacos a estudiar	57
7.1. Candesartán cilexetilo	57
7.2. Valsartán	59
7.3. Clonazepam	60
Capítulo II: OBJETIVOS.....	63
Capítulo III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	64

1. Compuestos y productos ensayados	64
1.1. Candesartán cilexetilo	64
1.2. Valsartán	64
1.3. Clonazepam	64
2. Técnicas experimentales.....	65
2.1. Concentración de saturación.....	65
2.1.1. Soluciones de trabajo	65
2.1.2. Técnica experimental	65
2.1.3. Tratamiento de las muestras	66
2.2. Ensayo de disgregación	66
2.3. Perfiles de disolución	67
2.3.1. Aparatos de disolución y condiciones de los ensayos.....	67
2.3.2. Prueba de comparación	69
2.4. Ensayo de permeabilidad en animales.....	70
2.4.1. Animales de experimentación.....	70
2.4.2. Soluciones de trabajo	70
2.4.2.1. Solución anestésica	70
2.4.2.2. Soluciones de lavado intestinal.....	71
2.4.3. Técnica experimental en intestino delgado completo.....	72
2.4.4. Ensayo de reabsorción de agua	75
2.4.5. Cálculo de la constante aparente de la velocidad de absorción.....	76
2.5. Valoración de muestras.....	77
2.5.1. Método cromatográfico.....	77
3. Validación de los métodos analíticos	79
3.1. Ensayo de linealidad	79
3.2. Ensayo de exactitud	81
3.3. Ensayo de precisión	81
3.4. Ensayo de estabilidad	82
3.5. Ensayo de influencia de filtro.....	82
3.6. Ensayo de especificidad.....	83
3.7. Ensayo de robustez.....	83
3.8. Límite de detección y cuantificación.....	83
4. Métodos matemáticos y estadísticos.....	84
4.1. Análisis de regresión	84
4.2. Pruebas de comparación de medias	84
4.3. Análisis de varianza global: ANOVA de un factor	84
4.4. Prueba de comparación múltiple: Prueba de Scheffé	85

5.	Correlación <i>In vivo-In vitro</i>	85
5.1.	Modelo de Loo-Rigelman	85
5.2.	Modelo de Weibull para ajustar los perfiles de disolución	87
5.3.	Correlación en dos pasos.....	87
Capítulo IV: Resultados.....		89
1.	Candesartán cilexetilo	90
1.1.	Validación del método analítico para candesartán cilexetilo	90
1.1.1.	Linealidad	90
1.1.2.	Exactitud.....	91
1.1.3.	Precisión (repetibilidad) y precisión intermedia	91
1.1.4.	Estabilidad.....	92
1.1.5.	Influencia de filtro	92
1.1.6.	Especificidad	93
1.1.7.	Robustez	93
1.2.	Concentración de saturación de candesartán cilexetilo	94
1.2.1.	Medios de disolución biofarmacéuticos	94
1.2.2.	Medios de disolución biopredictivos	95
1.2.3.	Excipientes	96
1.2.4.	Producto terminado	98
1.3.	Ensayo de disgregación para las formulaciones de candesartán cilexetilo.....	100
1.4.	Perfiles de disolución de las formulaciones de candesartán cilexetilo	100
1.4.1.	Aparato de disolución II, paletas.....	100
1.4.2.	Aparato de disolución IV, celda de flujo.....	112
1.5.	Comparación de los perfiles de disolución con el factor de similitud f_2 para las formulaciones de candesartán.....	115
1.5.1.	Factor de similitud f_2 , Aparato II. 50 r.p.m.....	115
1.5.2.	Factor de similitud f_2 , Aparato IV. 8 mL/min.....	115
1.6.	Ensayos <i>in situ</i> para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de candesartán	116
1.7.	Ensayos <i>in situ</i> para determinar el efecto de los excipientes sobre la permeabilidad de candesartán cilexetilo.....	120
1.8.	Correlación <i>In vivo-In vitro</i> para candesartán.....	125
1.8.1.	Ensayo de bioequivalencia <i>in vivo</i>	125
1.8.2.	Perfil de absorción según el modelo de Loo-Riegelman	126
1.8.3.	Escalado del perfil de disolución <i>in vitro</i>	128
1.8.4.	Perfil de disolución ajustado al modelo de Weibull.....	129
1.8.5.	Levy Plot.....	131
1.8.6.	Recta de correlación.....	133
1.8.7.	Grado de predictibilidad de la correlación	134

2. Valsartán	138
2.1. Validación del método analítico para valsartán	138
2.1.1. Linealidad	138
2.1.2. Exactitud	139
2.1.3. Precisión (repetibilidad) y precisión intermedia	139
2.1.4. Estabilidad	140
2.1.5. Influencia de filtro	141
2.1.6. Especificidad	141
2.1.7. Robustez	141
2.2. Concentración de saturación de valsartán	141
2.2.1. Medios de disolución biofarmacéuticos	141
2.2.2. Medios de disolución biopredictivos	143
2.2.3. Excipientes	143
2.2.4. Producto terminado	146
2.3. Ensayo de disgregación	147
2.4. Perfiles de disolución de las formulaciones de valsartán	147
2.4.1. Aparato de disolución II, paletas	147
2.4.2. Aparato de disolución IV, celda de flujo	159
2.5. Comparación de las cinéticas de disolución con factor de similitud f_2 para las formulaciones de valsartán	162
2.5.1. Factor de similitud f_2 . Aparato II. 50 r.p.m.	162
2.5.2. Factor de similitud f_2 . Aparato IV. 8 mL/min	162
2.6. Ensayos <i>in situ</i> para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de valsartán	163
2.7. Ensayos <i>in situ</i> para determinar el efecto de los excipientes sobre la permeabilidad de valsartán	167
3. Clonazepam	172
3.1. Validación del método analítico para clonazepam	172
3.1.1. Linealidad	172
3.1.2. Exactitud	174
3.1.3. Precisión (repetibilidad) y precisión intermedia	175
3.1.4. Estabilidad	176
3.1.5. Influencia de filtro	176
3.1.6. Especificidad	176
3.1.7. Robustez	176
3.2. Concentración de saturación de clonazepam	177
3.2.1. Medios de disolución biofarmacéuticos	177
3.2.2. Medios de disolución biopredictivos	178
3.2.3. Excipientes	178
3.2.4. Producto Terminado	181

3.3.	Ensayo de disgregación	182
3.4.	Perfiles de disolución	182
3.4.1.	Aparato de disolución II, paleta	182
3.4.2.	Aparato de disolución IV, celda de flujo.....	194
3.5.	Comparación de las cinéticas de disolución con factor de similitud f_2	197
3.5.1.	Factor de similitud f_2 . Aparato II. 50 r.p.m.....	197
3.5.2.	Factor de similitud f_2 . Aparato IV. 8 mL/min.....	197
3.6.	Ensayos <i>in situ</i> para determinar el efecto de la formulación de sobre la permeabilidad del clonazepam	198
3.7.	Ensayos <i>in situ</i> para determinar el efecto de los excipientes sobre la permeabilidad	201
Capítulo V: Discusión.....		207
1.	Fármacos estudiados	207
Formulación		210
2.	Métodos de cuantificación de muestras	210
3.	Diseño de estudios	211
4.	Interpretación de resultados.....	214
4.1.	Candesartán cilexetilo	214
4.2.	Valsartán	225
4.3.	Clonazepam	230

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo de genéricos. Bioequivalencia y su marco regulatorio

Un medicamento genérico es aquel que tiene la misma composición cualitativa y cuantitativa en principios activos, la misma forma farmacéutica y cuya bioequivalencia con el medicamento de referencia haya sido demostrada por estudios adecuados de biodisponibilidad ⁽¹⁾. La bioequivalencia ha procurado una ruta adecuada para el acceso a medicamentos seguros, eficaces y de calidad a un precio accesible, y, en forma indirecta, ha hecho sustentable a los sistemas sanitarios que adoptan la prescripción de medicamentos genéricos sin poner en riesgo la salud de los pacientes. Por otra parte, el crecimiento del mercado de medicamentos para el tratamiento de enfermedades crónicas ha hecho que la industria farmacéutica encuentre en los genéricos una posibilidad de expansión.

El desarrollo de genéricos conlleva estudios que permitan establecer, con base científica, que los productos que se desarrollan son equivalentes farmacéuticos y equivalentes terapéuticos del producto de referencia y, con ello, garantizar la calidad, seguridad y eficacia requerida para la producción y comercialización de cualquier medicamento. Si se estableciesen tales condiciones se considera que la formulación en desarrollo es intercambiable con el producto de referencia.

La equivalencia farmacéutica se demuestra al valorar y encontrar resultados dentro de especificaciones de las propiedades físicas y químicas de los principios activos y se debe además garantizar su estabilidad dentro de la formulación. Con este fin se evalúan desde las características organolépticas y propiedades mecánicas hasta las características químicas, posológicas y biofarmacéuticas. Sin embargo, no basta con ello para que un

producto sea considerado equivalente farmacéutico de otro, sino que requiere que el laboratorio fabricante cumpla con las normas de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) ^{(2) (3) (4)}.

Una vez que se establece la equivalencia farmacéutica, es necesario establecer la equivalencia terapéutica. Para el establecimiento de la equivalencia terapéutica es necesario realizar estudios de bioequivalencia *in vivo*. Un estudio de bioequivalencia cuya finalidad es demostrar la intercambiabilidad de un equivalente farmacéutico con un producto de referencia consiste en demostrar que ambos productos poseen biodisponibilidades comparables tanto en cantidad como en velocidad. En general, para evaluar la biodisponibilidad de cada formulación se recurre a establecer los siguientes parámetros farmacocinéticos: área bajo la curva (ABC), concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y tiempo de concentración máximo ($T_{m\acute{a}x}$) ⁽⁵⁾. Para obtener los parámetros farmacocinéticos antes mencionados es necesario realizar un estudio clínico que abarque tres etapas: clínica, bioanalítica y de análisis estadístico. Estos estudios se realizan en centros especializados y acreditados que dispongan de infraestructura, equipos especializados y que, además, cuenten con personal y procedimientos adecuados a fin de poder diseñar, ejecutar, monitorear, documentar, analizar y reportar los estudios de bioequivalencia cumpliendo las Buenas Prácticas Clínicas (BPC) y las BPL, así como las regulaciones que sean aplicables según el país o grupo de países donde se quiera registrar el producto en desarrollo ⁽⁶⁾.

Las agencias regulatorias a nivel mundial tienen establecidas sus normativas en materia de bioequivalencia y la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha generado documentos con recomendaciones sobre el mismo tópico. La armonización de estas normas puede resultar un gran avance para el registro y la autorización de genéricos a nivel global. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) publicó en 2010 su guía regulatoria en materia de bioequivalencia mientras que la guía de la Food and Drug Administration (FDA) data de 2003. Aunque existen diferencias entre ellas, el objetivo común es establecer la reglamentación para la aprobación de genéricos por parte de las agencias regulatorias de

la Comunidad Económica Europea y Estados Unidos, respectivamente.

En la guía de la FDA el concepto de bioequivalencia es “ausencia de una diferencia significativa en la velocidad y grado en que un ingrediente activo, de equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas, está disponible en el sitio de acción del fármaco cuando se administra en la misma dosis molar en condiciones similares en un estudio diseñado apropiadamente” y el concepto de biodisponibilidad es “velocidad y cantidad en la que un ingrediente activo se absorbe desde un producto y se hace disponible en el sitio de acción”.

En la guía de la FDA se establecen como métodos para documentar la bioequivalencia: estudios farmacocinéticos, estudios farmacodinámicos, estudios clínicos comparativos, estudios *in vitro*, mientras que la EMA establece para ese mismo fin los estudios farmacocinéticos comparativos y aclara específicamente el diseño del estudio, lo que ayuda al fabricante a optimizar la forma en que se realiza el estudio de bioequivalencia. En cuanto al diseño del estudio la FDA recomienda un estudio cruzado no replicado. Sin embargo, los diseños replicados pueden ser usados y la EMA recomienda el uso de un diseño cruzado de dosis única, aleatorio, de dos períodos y dos secuencias y señala de forma descriptiva los requisitos que deben reunir los voluntarios que pueden participar en el estudio. En cuanto a los parámetros a evaluar, la FDA solo señala concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y área bajo la curva (ABC) mientras que la EMA es más específica al enumerar ABC (0-t), ABC (0- ∞), área residual, $C_{m\acute{a}x}$, tiempo máximo plasmático ($T_{m\acute{a}x}$) y establecer que se deben usar métodos no compartimentales para la estimación de los parámetros farmacocinéticos.

Con respecto a los estudios *in vitro*, la FDA señala los estudios de disolución como alternativa a los estudios en humanos. Existe una guía sobre bioexenciones basadas en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico mientras que en el apéndice III de la guía de la EMA se establecen las directrices para las bioexenciones basadas en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾.

2. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB) fue propuesto por Amidon y colaboradores ⁽⁹⁾ en 1995.

La Ley de Fick para la difusión puede emplearse para explicar los parámetros que determinan el paso de moléculas a través de dicha membrana. Así, la difusión pasiva a través de la membrana intestinal puede expresarse según la siguiente ecuación:

$$J = \frac{1}{A} \cdot \frac{\partial M}{\partial t} = P_{eff} \cdot C$$

En dicha ecuación J es el transporte de fármaco a través de la barrera intestinal, A es la superficie del intestino, $\partial M/\partial t$ representa la velocidad de absorción, P_{eff} es la permeabilidad efectiva del fármaco y C es la concentración del fármaco en el lumen intestinal ⁽¹⁰⁾. Así, la velocidad de absorción de un fármaco depende de su permeabilidad a través de la membrana y de su concentración en el lumen intestinal y la cantidad total de fármaco que se absorbe depende de estos mismos factores y del tiempo que permanece el fármaco disponible para su absorción. La concentración en el lumen depende de la solubilidad y de la velocidad de disolución del fármaco *in vivo*.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se puede afirmar que dos formas farmacéuticas orales de liberación inmediata, que contengan el mismo principio activo y tengan los mismos perfiles de concentración en función del tiempo en el lumen intestinal, tendrán la misma velocidad y grado de absorción. Esta premisa se cumplirá si ninguno de los componentes de las formulaciones afecta la permeabilidad de la membrana o al tiempo de tránsito intestinal y si ambas formulaciones tienen el mismo perfil de disolución en todas las condiciones lumbinales.

Teniendo en cuenta lo mencionado, el SCB propone que los fármacos se clasifiquen atendiendo a su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal dado que éstos son los principales factores que determinan la absorción de fármacos que se administran por vía oral. En la figura 1 se puede observar la clasificación de los fármacos según el SCB ⁽¹¹⁾.

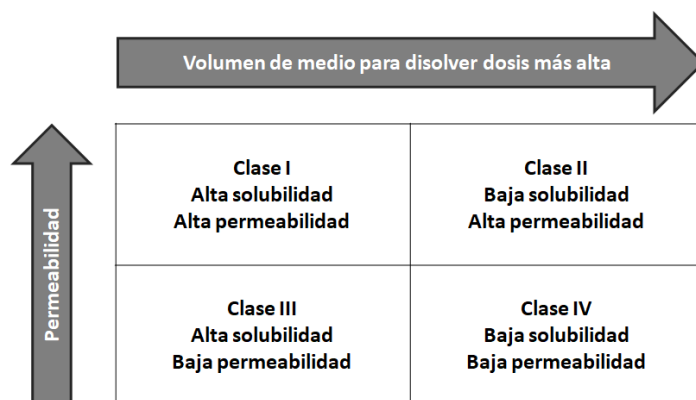


Figura 1: Clasificación de los fármacos según el SCB

Actualmente se considera que un fármaco es de alta solubilidad si la dosis más alta se disuelve en 250 mL o menos en todas las condiciones luminales, es decir, a pH entre 1,2 y 6,8. Un fármaco se considera de alta permeabilidad si su grado de absorción es igual o mayor que 85%.

Para caracterizar un fármaco según el SCB se propusieron tres números adimensionales, que son el número de dosis (Do), el número de absorción (An) y el número de disolución (Dn).

El número de dosis representa, de forma intuitiva, el número de vasos de agua que se necesitan para disolver la dosis de fármaco más elevada. Se calcula según la ecuación que se presenta a continuación:

$$Do = \frac{D/250}{C_s}$$

D es la dosis más alta del fármaco, 250 representa el volumen de agua con el que normalmente se administra una forma farmacéutica a un paciente (un vaso de agua) y C_s es la solubilidad del fármaco. En fármacos de alta solubilidad, la velocidad de disolución no está limitada por la solubilidad y por tanto la absorción no depende de ambas.

El número de absorción es la razón entre el tiempo de residencia (T_{res}) y el tiempo de absorción (T_{abs}). También se puede expresar como el cociente entre la permeabilidad (P_{eff}) y el radio del intestino (R) multiplicado por el tiempo de residencia:

$$An = \frac{P_{eff}}{R} \cdot \langle T_{res} \rangle = \frac{\langle T_{res} \rangle}{\langle T_{abs} \rangle}$$

Aquellos compuestos con alta permeabilidad requieren muy poco tiempo para absorberse y lo harán completamente durante su tránsito intestinal. La premisa anterior se cumple siempre que no se modifique la liberación del fármaco por algún factor relacionado con la formulación.

El número de disolución es la relación entre el tiempo de residencia y el tiempo de disolución (T_{diss}). El tiempo de disolución depende de la difusividad (D), el radio inicial de las partículas (r), solubilidad (C_s) y densidad (ρ).

$$Dn = \left(\frac{3D}{r^2} \right) \cdot \left(\frac{C_s}{\rho} \right) \cdot \langle T_{res} \rangle = \frac{T_{res}}{T_{diss}}$$

La disolución rápida asegura que la disolución *in vivo* no es el factor limitante del proceso de absorción ⁽¹²⁾.

Atendiendo a la capacidad de ionización que pueden tener los ácidos y bases débiles, Tsume y colaboradores propusieron una subclasificación de las clases II y IV dentro del SCB ⁽¹³⁾. En dicha propuesta, se consideran aquellos fármacos con comportamiento ácido (a), básico (b) o neutro (c), según sus grupos ionizables en dos valores de pH que son representativos del

tracto gastrointestinal (pH 2 y pH 6,5). En la tabla 1 se muestra la subclasificación antes descrita.

Subclasificación del SCB	Solubilidad pH 2	Solubilidad pH 6,5	Permeabilidad
I	Alta	Alta	Alta
Ila	Baja	Alta	Alta
Ilb	Alta	Baja	Alta
Ilc	Baja	Baja	Alta
III	Alta	Alta	Baja
IVa	Baja	Alta	Baja
IVb	Alta	Baja	Baja
IVc	Baja	Baja	Baja

Tabla 1: Subclasificación del SCB según solubilidad a pH 2 y pH 6,5 de fármacos ácidos (a), fármacos básicos (b) y neutros (c) ⁽¹³⁾.

Las subclases propuestas por estos investigadores se basan en las propiedades de ionización de los fármacos y esta subclasificación puede resultar en una excelente herramienta para el desarrollo de métodos de disolución que permitan predecir el comportamiento *in vivo* y también permite el desarrollo de metodologías para predecir la absorción.

Los fármacos de la subclase Ila son ácidos débiles y se clasifican en el SCB como de baja solubilidad por su poca capacidad de disolverse a pH gástrico, sin embargo, a valores de pH en torno a 4 se comportan de forma similar a los fármacos de la clase I. Los fármacos de la subclase Ila podrían ser absorbidos completamente gracias a su alta permeabilidad, alta solubilidad y rápida disolución a nivel intestinal, siempre que el tiempo de residencia en el intestino sea suficiente.

En el caso de los fármacos de la subclase Ilb (bases débiles) son de alta solubilidad a nivel estomacal y en el tramo proximal del intestino delgado; por el contrario, en la porción distal del intestino delgado, ciego e intestino grueso, la solubilidad será baja. Bajo estas

condiciones se espera que los fármacos de la subclase IIb precipiten en cuanto alcancen la zona distal del intestino, ya que pasan de un medio que favorece su disolución a condiciones menos favorables. Para este tipo de fármacos se deben considerar como factores que determinan la absorción la velocidad de vaciamiento gástrico, la permeabilidad y la precipitación.

En los fármacos neutros o de la clase IIc, la solubilidad no se ve condicionada por los cambios de pH del tracto gastrointestinal. En las formulaciones de este tipo de fármacos, la disolución se verá condicionada por el medio gástrico pues éste afecta a la disgregación. La solubilidad de este tipo de fármacos y la velocidad de disolución desde la formulación está determinada por el tamaño de las partículas, distribución del tamaño de las mismas, factores inherentes a la formulación y condiciones del entorno luminal.

Otra característica de este tipo de fármacos es que su absorción puede ser alta en ciego y colon debido a que una cantidad muy importante de fármaco puede alcanzar esta zona del intestino ⁽¹³⁾.

2.1. Bioexenciones basadas en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

El término bioexención se aplica cuando se permite, desde el punto de vista regulatorio, la sustitución de los estudios de bioequivalencia *in vivo* por datos derivados de los ensayos de disolución *in vitro*. En general, una bioexención consiste en un estudio comparativo de los perfiles de disolución *in vitro* entre la formulación que está en desarrollo y una formulación de referencia.

El SCB representa una base científica de gran solidez que ha permitido establecer los escenarios en los que los estudios de equivalencia *in vitro* son suficientes o más discriminativos que los estudios de bioequivalencia *in vivo*. De acuerdo a lo señalado por Amidon y colaboradores, para los fármacos de las clases I y III los estudios de disolución aportan una excelente evidencia de equivalencia entre dos formulaciones, incluso por

encima de los estudios *in vivo*, ya que con los estudios en humanos se pueden presentar variaciones en los niveles plasmáticos del fármaco que se deben a modificaciones del tránsito intestinal y gástrico, lo que disminuye su capacidad para predecir las diferencias que puedan existir entre las formulaciones a comparar ⁽¹⁴⁾.

Los entes regulatorios a nivel mundial han adoptado las bioexenciones como mecanismos para la aprobación de genéricos de aquellas formas farmacéuticas orales de liberación inmediata que contengan fármacos de las clases I y III del SCB, que sean de acción sistémica y no sean de estrecho margen terapéutico. Para ello la empresa que desarrolla el medicamento genérico debe documentar, tras la realización del estudio respectivo, que el principio activo es de alta solubilidad a los pHs representativos del tracto gastrointestinal. Se suele evaluar la solubilidad a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Con fines de bioexención se debe calcular el número de dosis y presentar el perfil pH-solubilidad. Con respecto a la permeabilidad se realiza la clasificación empleando algún método adecuado que debe estar previamente validado.

La bioexención se aprueba siempre que se presenten perfiles de disolución similares entre el producto en desarrollo y el producto de referencia. Estos perfiles deben realizarse a los pHs representativos del tracto gastrointestinal; generalmente se consideran adecuados como medios los amortiguados descritos en las farmacopeas con pH 1,2; 4,5 y 6,8. En la actualidad las agencias regulatorias consideran que para aprobarse una bioexención de una formulación que contenga un fármaco clase I, la forma farmacéutica debe presentar una disolución muy rápida ($\geq 85\%$ en 15 minutos) o rápida ($\geq 85\%$ en 30 minutos) y ser similar al perfil del producto de referencia a pH 1,2; 4,5 y 6,8. En el caso de formulaciones que contengan un fármaco de la clase III, la disolución debe ser muy rápida ($\geq 85\%$ en 15 minutos) y con perfiles similares al producto de referencia a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Los estudios de disolución en los que se apoyan las bioexenciones se deben realizar en el aparato de paletas a 50 rpm o en el aparato de cestas a 100 rpm. En general está establecido que estos estudios deben realizarse con 900 mL de medio, sin embargo, en la guía más reciente de la

FDA sobre bioexenciones se establece el volumen de 500 mL, que parece más cónsono con la realidad fisiológica.

En todos los casos de bioexención debe garantizarse además que los excipientes presentes en la formulación a desarrollar sean similares a los del producto de referencia y en ningún caso debe contener excipientes que puedan afectar la permeabilidad o el tránsito intestinal, como es el caso del manitol o los tensoactivos ⁽¹⁵⁾.

3. Estudios de Solubilidad. Modelos experimentales.

La solubilidad es uno de los parámetros más importantes a considerar durante el desarrollo de principios activos y formas farmacéuticas. La solubilidad se define como la cantidad máxima de una sustancia que disuelve en un volumen de solvente, obteniéndose una solución saturada a temperatura y presión constante. Un método ideal para determinar la solubilidad es aquel que requiere una mínima cantidad de sustancia y a su vez permite establecer la influencia que tienen el pH y otros aspectos biopredictivos sobre la solubilidad ⁽¹⁶⁾. De acuerdo al SCB un fármaco es considerado altamente soluble si su más alta dosis es soluble en un volumen igual o menor que 250 mL en el intervalo de pH entre 1,2 y 6,8 a una temperatura de 37°C. Los entes regulatorios coinciden en recomendar para la clasificación en cuanto a solubilidad el método de agitación del matraz; en su defecto, recomiendan usar otro método debidamente justificado.

Existen factores que determinan la capacidad que tiene una sustancia para disolverse en un medio acuoso, entre ellos están:

- Tamaño de las partículas: si se disminuye el tamaño de las partículas, la superficie específica de sólido en contacto con el solvente aumenta y por tanto su velocidad de disolución se verá incrementada.
- Forma cristalina: si un fármaco presenta polimorfos, éstos pueden presentar distintas características de solubilidad. Las formas amorfas suelen presentar, por lo general, una solubilidad mayor que las formas cristalinas. La hidratación de una

molécula puede tener también un efecto sobre la solubilidad de una sustancia.

- Capacidad de ionización: los ácidos y bases débiles en disolución se encuentran disociados y la solubilidad de las moléculas ionizables está determinada por el pH del medio. Este comportamiento puede ser explicado mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch y atendiendo a ésta se puede afirmar que de forma general los ácidos débiles se disolverán mejor (en algunos casos completamente) en medios con pH por encima de su pKa, ya que estará completamente ionizada la molécula; lo contrario sucederá con las bases débiles.
- Contraión: en el caso de tratarse de una sal, éste es un aspecto a considerar porque diferentes contra iones pueden presentar diferentes comportamientos de solubilidad.

Otros aspectos que deben tenerse en cuenta son la capacidad de agregación y adsorción del sólido, así como la posibilidad de formar micelas ^{(17) (18) (19)}.

Para la determinación experimental de la solubilidad en forma experimental se han desarrollado diferentes métodos, a continuación una descripción de los mismos.

3.1. Método de agitación del matraz

Este método fue propuesto por Higuchi y Connors y sigue siendo ampliamente usado para determinar la solubilidad de fármacos ⁽²⁰⁾. El objetivo de este método es obtener una solución saturada de la sustancia en estudio a un pH y a una temperatura definida; para ello el sólido es colocado en exceso en un medio a un pH determinado obteniéndose una suspensión que se procede a agitar por un tiempo definido previamente, cuidando de mantener la temperatura controlada durante el tiempo del ensayo. La observación de sólido no disuelto durante el tiempo de agitación permite garantizar que se logrará un estado de saturación y se debe agitar hasta lograr el equilibrio de saturación que para sustancias altamente solubles se logra en menor tiempo que para aquellas con bajas solubilidades. Una vez culminada la etapa de agitación se debe tener un período de

sedimentación para luego proceder a filtrar o separar por extracción del sobrenadante usando un procedimiento adecuado para posteriormente determinar la concentración por cuantificación de la muestra empleando un método analítico previamente validado. En general, se prefiere usar cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación ya que no solo permite cuantificar el analito en estudio sino que también permite separar y observar impurezas y productos de degradación con lo que se puede establecer la estabilidad del analito frente a las condiciones de estudio ⁽²¹⁾.

Con fines de dar clasificación en el SCB es necesario que el estudio experimental de solubilidad incluya los pHs representativos del tracto gastrointestinal (entre 1,2 y 6,8) y los resultados deben presentarse incluyendo un perfil de pH-solubilidad. En el caso de optar a una bioexención es necesario que en todos los pHs estudiados el número de dosis sea menor que la unidad.

3.2. Método de titulación potenciométrica

Este método consiste en adicionar cantidades exactamente medidas de una solución valorada de ácido o base a una solución que contiene disuelto el fármaco a estudiar y cloruro de potasio 0,15 M, con la finalidad de aumentar la exactitud en la medida. Al sistema se le incorpora argón para evitar que el dióxido de carbono atmosférico tenga influencia sobre el valor del pH. La determinación del pH se hace de forma continua empleando un electrodo de vidrio con lo que se obtiene una curva de titulación potenciométrica en función del volumen de solución ácido/base consumido. La determinación de la solubilidad con este método se basa en el desplazamiento característico de la curva de titulación que es causada por la precipitación del sólido en el medio. Es un método que requiere pequeñas cantidades de sustancia pero se limita a sustancias ionizables ⁽²²⁾.

3.3. Método turbidimétrico

En este método el compuesto a estudiar se disuelve en un solvente orgánico que

generalmente es dimetilsulfóxido (DMSO) obteniéndose una solución que se adiciona a una solución tamponada a pH 7 en intervalos de un minuto entre cada adición. Después de la primera detección de turbidez por dispersión de la luz, se agregan algunas alícuotas adicionales de la solución y se grafica el volumen adicionado en función de la turbidez y la solubilidad se estima por extrapolación del punto donde comenzó la precipitación. Este método es de alta capacidad de cribado ya que con él se pueden medir hasta 300 muestras por día, sin embargo, el DMSO puede producir soluciones supersaturadas y por ello se puede sobrestimar la solubilidad. Otro inconveniente de este método es que no se puede identificar la forma cristalina en la que el sólido precipita y la forma que más rápido precipita, no siempre es la más estable y esto supone un problema, ya que los polimorfos pueden diferir enormemente en sus solubilidades. Por otro lado, el pH y las impurezas del fármaco no se detectan con este método, lo que conlleva a una estimación insuficiente ⁽²³⁾.

3.4. Método *in silico* para predecir la solubilidad

Las metodologías para predecir la solubilidad acuosa se pueden dividir en tres categorías:

- a) Métodos que usan propiedades físico-químicas experimentales (coeficiente de reparto, punto de fusión, punto de ebullición, volumen molar)
- b) Métodos basados en descriptores físico-químicos, propiedades moleculares, o colección de características estructurales relevantes relacionadas con la actividad o propiedad biológica a través de diversas técnicas estadísticas como regresión lineal múltiple y redes neuronales
- c) Métodos basados en contribuciones de grupo ⁽²⁴⁾.

Así, por ejemplo, la ecuación de Yalkowsky combina dos parámetros físicos que son de importancia fundamental en la solubilidad de una molécula:

$$\log S = 0,8 - \log P - 0,01(PF - 25)$$

en donde $\log P$ es el coeficiente de reparto y PF es el punto de fusión. El $\log P$ es una medida de la energía de solvatación y el punto de fusión de la energía reticular.

Programas como WSKOWWIN y ACD/Solubility DB basan su cálculo de solubilidad de una molécula en la ecuación de Yalkowsky ⁽²⁵⁾.

De manera general, los modelos computacionales para predecir la solubilidad son modelos empíricos de relación cuantitativa/cualitativa estructura-propiedad (QSPR) en donde los modelos son entrenados con diversos grupos de datos de solubilidad que son tomados de la literatura, de bases de datos corporativas o generados para fines de modelación. Para el desarrollo de modelos QSPR de solubilidad se construye la base de datos, se calculan los descriptores moleculares, se diseñan las series de entrenamiento y predicción, se desarrolla el modelo y finalmente se valida ⁽²⁶⁾.

3.5. Estudios de Solubilidad. Efecto de excipientes

Los excipientes son las sustancias auxiliares que permiten el diseño de una forma farmacéutica y optimizar su proceso de manufactura. Los excipientes son usados de forma tal que se garantice la calidad, seguridad, eficacia y estabilidad de las formas farmacéuticas y por tanto son esenciales para las mismas. En forma general, los excipientes se consideran farmacológicamente inertes, sin embargo, a la luz de los estudios realizados se ha observado que pueden interaccionar con el fármaco y modificar su biodisponibilidad.

La solubilidad de un fármaco desde una forma farmacéutica puede verse afectada por efecto de los excipientes cuando éstos modulen la disgregación de la forma farmacéutica, la disolución del fármaco y el pH del medio.

Los excipientes como croscarmelosa sódica, crospovidona, almidón y almidón glicolato de sodio son usados como disgregantes de formas farmacéuticas sólidas, mejorando de este modo la magnitud y velocidad de disolución del fármaco. Si la disolución es el paso limitante de la absorción, el uso de estos excipientes mejorará la biodisponibilidad del fármaco ⁽²⁷⁾.

El pH de los fluidos del tracto gastrointestinal influye de forma significativa en la absorción, ya que la mayoría de los fármacos son ácidos y bases débiles cuya solubilidad depende del

pH; así, un pH que favorezca la ionización mejorará la disolución del fármaco. El bicarbonato de sodio, por ejemplo, incorporado en comprimidos con ibuprofeno, puede conllevar una más rápida absorción de este último debido a que el bicarbonato reacciona con el ácido clorhídrico del estómago provocando la formación de dióxido de carbono que mejora la disgregación por el efecto de efervescencia y además mejora la solubilidad del ibuprofeno debido a la ionización del fármaco en un medio con un pH mayor por efecto del bicarbonato (28) (29).

Por otro lado, las interacciones fármaco-excipiente o excipiente-excipiente pueden afectar la biodisponibilidad de los fármacos.

La formación de complejos empleando un excipiente puede modificar las características iniciales de solubilidad, estabilidad y coeficiente de difusión de un fármaco. Las ciclodextrinas, por ejemplo, pueden mejorar la solubilidad y estabilidad de un gran número de principios activos por la formación de complejos de inclusión (30). Los procesos unitarios que ponen en contacto íntimo a los principios activos y los excipientes tales como molienda, secado, precipitación o la formación de dispersiones sólidas pueden mejorar la solubilidad de los fármacos o mejorar su velocidad de disolución. Por ejemplo, el meloxicam, que es una molécula con poca solubilidad, incrementa su velocidad de disolución cuando se formula con PEG6000 (31). La carbamazepina mejoró su solubilidad y biodisponibilidad cuando se empleó clorhidrato de glucosamina como vehículo hidrofílico en su formulación (32).

La adsorción de fármacos a la superficie de los excipientes puede alterar la magnitud y velocidad de liberación de los fármacos y por tanto afectar su biodisponibilidad. La adsorción de fármacos a excipientes que promuevan su humectación mejora la liberación de los mismos. La capacidad de adsorción y el área superficial del excipiente determinarán el grado de adsorción del fármaco a éste. Esta adsorción puede incrementar la velocidad de liberación del fármaco debido a un incremento en el área superficial del fármaco expuesto

al medio pero también puede disminuir la liberación del fármaco cuando el fármaco se une fuertemente a un excipiente insoluble ⁽²⁷⁾.

4. Estudios de Permeabilidad. Modelos experimentales.

El estudio del grado de absorción en humanos permite clasificar, en cuanto a permeabilidad, a los fármacos según el SCB. Todos aquellos fármacos cuya absorción oral absoluta sea igual o mayor al 85% de la dosis administrada se consideran de alta permeabilidad ⁽³³⁾ ⁽³⁴⁾ ⁽³⁵⁾. La caracterización en cuanto a permeabilidad se basa indirectamente en el grado de absorción de un fármaco en humanos y directamente en la medida de la velocidad de la transferencia de masa a través de la membrana intestinal. Para determinar la permeabilidad de un fármaco puede recurrirse a estudios en humanos o a estudios en otros modelos más sencillos como el animal o celular. Éstos últimos requieren de una validación previa y deben además demostrar que son adecuados para el fin que se emplean. Un fármaco se clasificará como altamente permeable si su permeabilidad es igual o mayor que la de un estándar interno con alta permeabilidad, que en la mayoría de los casos es el metoprolol. La permeabilidad de metoprolol ha sido estudiada en humanos empleando la técnica de intubación y perfusión mostrando que su absorción ocurre tanto en duodeno como en yeyuno. Además se han realizado estudios farmacocinéticos con metoprolol radiomarcado que han permitido documentar sus metabolitos y características de excreción después de la administración oral e intravenosa ⁽³⁶⁾.

4.1. Estudios de permeabilidad en humanos

a.) Métodos indirectos

-Estudio farmacocinético de balance de masas: es un estudio que se realiza con el fármaco radiomarcado y consiste en un estudio farmacocinético completo. Para ello se administra por vía oral a voluntarios sanos el fármaco radiomarcado y luego se recolectan muestras de sangre, orina y heces para cuantificar en las diferentes muestras el fármaco y sus metabolitos ⁽³⁷⁾.

-Estudio de biodisponibilidad absoluta: consiste en la comparación de la biodisponibilidad de un fármaco administrado por vía oral y la biodisponibilidad de la misma dosis administrada por vía intravenosa. Con estos estudios se puede obtener información sobre la distribución y eliminación del fármaco y puede determinarse de forma indirecta su permeabilidad oral. Así mismo, se puede establecer la influencia de enzimas y transportadores presistémicos que afectan la biodisponibilidad oral del fármaco. Para realizarlo es importante conocer con exactitud los metabolitos que se pueden encontrar en las muestras biológicas estudiadas (sangre u orina). El área bajo la curva de la dosis oral entre el área bajo la curva de la dosis intravenosa (normalizado por la dosis) representa la biodisponibilidad absoluta del fármaco administrado por vía oral ⁽³⁸⁾.

b.) Método directo

Este método conocido como Loc-I-Gut consiste en la perfusión, a través de una sonda, de un segmento del intestino con una solución del fármaco. El segmento es aislado empleando un balón en la zona proximal y uno en la zona distal. La determinación de la permeabilidad se determina como función de la desaparición del fármaco en el segmento perfundido ⁽³⁹⁾.

4.2. Estudios de permeabilidad en modelos animales *in situ*

Estos modelos presentan como característica que las condiciones neurales, sanguíneas y linfáticas de la zona en estudio permanecen inalteradas y por ello es un modelo que resulta sensible a las influencias farmacológicas y fisiológicas. Los estudios *in situ* pueden ser:

-Método de paso único sin recirculación (single pass): consiste en perfundir un segmento del intestino con una solución del fármaco a una velocidad controlada. La permeabilidad se calcula en función de la desaparición del fármaco en el lumen intestinal. Con este método se puede controlar además de la velocidad de entrada del fármaco, la concentración del mismo, el pH y la osmolaridad en la solución empleada ⁽⁴⁰⁾.

-Método de Doluisio o *in situ* con recirculación (closed loop): en este método se coloca una solución del fármaco a ensayar en un segmento del intestino y se mantiene durante un lapso de tiempo, tomando muestras en los tiempos establecidos para observar la desaparición del fármaco de la luz intestinal ⁽⁴¹⁾ ⁽⁴²⁾.

4.3. Estudios de permeabilidad en modelos *in vitro*

-Estudios mediante Membrana Artificial Paralela (PAMPA): este método emplea un filtro recubierto de fosfolípidos que simula una membrana y separa dos compartimientos acuosos. Permite estudiar el transporte pasivo de moléculas pequeñas ⁽⁴³⁾. Su ventaja principal es que permite hacer un cribado rápido de muchas moléculas clasificándolos como de baja, media y alta probabilidad de absorción intestinal ⁽⁴⁴⁾ ⁽⁴⁵⁾.

-Estudios mediante cultivo celular: consiste en capas de células que crecen sobre filtros permeables que permiten la realización de estudios de transporte transepitelial de fármacos y nutrientes ⁽⁴⁶⁾. La línea celular más usada para estudios de absorción intestinal es la Caco-2 que fue establecida en 1977 por Fogh y colaboradores quienes las obtuvieron a partir de carcinoma de colon humano. Esta línea celular es capaz de diferenciarse de manera espontánea como células morfológica y funcionalmente similares a los enterocitos y presentan una clara polarización y uniones estrechas ⁽⁴⁷⁾ ⁽⁴⁸⁾.

La línea celular Caco-2 posee muchas enzimas de la estructura del borde de cepillo tales como la Glicoproteína-P, además de otros sistemas de transporte especializados ⁽⁴⁹⁾. Otra ventaja de este modelo es que la cara basolateral presenta la actividad ATP-asa dependiente de sodio-potasio ⁽⁵⁰⁾. Los estudios realizados hasta ahora permiten afirmar que este modelo *in vitro* permite clasificar la permeabilidad de fármacos tal como lo permiten otros modelos más complejos con ventajas como su rapidez y posibilidad de establecer tanto el mecanismo de absorción como el metabolismo intestinal ⁽⁵¹⁾.

Es necesario considerar que existen diferencias entre los valores de permeabilidad

obtenidos para un mismo fármaco en distintos laboratorios que pueden ser causadas por diferencias en las condiciones experimentales y líneas celulares; es por ello que el modelo debe ser validado previamente en cada laboratorio para poder emplearlo para clasificar un fármaco en el SCB ⁽⁵²⁾ ⁽⁵³⁾.

-Estudios basados en tejidos: para realizar estudios de absorción en estos modelos se usan segmentos intestinales de tejidos animales o humanos. En este tipo de estudios se coloca una solución del fármaco en la zona mucosa del tejido y se cuantifica la desaparición del fármaco de la solución o la aparición del fármaco en la zona serosa ⁽⁵⁴⁾.

Se distinguen dos tipos de modelos basados en tejidos:

Cámaras de difusión: en éstas el tejido epitelial se aísla y secciona con la finalidad de obtener capas planas de tejido que se colocan sobre celdas de difusión estándar a las que se les agregan los tampones adecuados para simular los fluidos extracelulares ⁽⁵⁵⁾. Este modelo permite establecer la permeabilidad de una sustancia en un tejido específico y permite estudiar el transporte intestinal paracelular y transcelular así como la secreción intestinal y la influencia del metabolismo intestinal sobre la biodisponibilidad de una sustancia ⁽⁵⁶⁾.

Método de sacos evertidos: este modelo consiste en emplear segmentos intestinales que se invierten y dividen en pequeñas secciones como sacos. Los segmentos se incuban en tampones oxigenados donde se ha colocado el fármaco que se desea estudiar y se controla la agitación y la temperatura. Se estudia la acumulación de fármaco en los segmentos empleados ⁽⁵⁷⁾. Este modelo permite estudiar la solubilidad como factor limitante de la absorción, la conversión de un profármaco en fármaco por efecto del tejido intestinal y definir el mecanismo de absorción del fármaco (transporte activo o pasivo) ⁽⁵⁸⁾.

4.4. Métodos preliminares e *in silico* para predecir la permeabilidad

Aunque la clasificación en cuanto a permeabilidad de un fármaco en el SCB con fines regulatorios requiere de un estudio en alguno de los modelos antes descritos, algunos métodos como el cálculo del coeficiente de reparto y los modelos *in silico* pueden resultar útiles desde el punto de vista de investigación y como métodos preliminares de clasificación.

El coeficiente de reparto permite predecir el proceso de reparto *in vivo* en las membranas biológicas. El proceso de absorción intestinal se inicia con la difusión en una membrana de carácter lipófilo, por lo tanto, esta característica fisicoquímica es de gran importancia para conocer la capacidad de una molécula de difundir a través de las membranas del epitelio intestinal ⁽⁵⁹⁾. El coeficiente de reparto mide la solubilidad diferencial de una sustancia en dos disolventes inmiscibles entre sí y se define como el cociente entre la concentración de la sustancia no ionizada en la fase orgánica (generalmente representada por el n-octanol) y la concentración del soluto no ionizado en la fase acuosa y generalmente se expresa en su forma logarítmica (LogP). El coeficiente de distribución (LogD) es el cociente de la suma de las concentraciones ionizadas y no ionizadas del soluto en ambas fases y en este caso el grado de ionización en la fase acuosa dependerá del pH de la misma.

En los últimos años se vienen adelantando un número importante de investigaciones con métodos *in silico* para predecir la permeabilidad intestinal. La mayoría de los modelos usados para predecir la permeabilidad son modelos empíricos de relación cuantitativa/cualitativa estructura-propiedad (QSPR), en los que se usan, para entrenar los modelos, datos de permeabilidad tomados de la literatura o datos de la base de datos de empresas farmacéuticas. También pueden usarse datos obtenidos en algún laboratorio específicamente con fines de realizar el modelado. En general, los modelos QSRP de permeabilidad intestinal siguen los pasos siguientes:

- a) Construcción de la base de datos
- b) Cálculo de los descriptores moleculares
- c) Diseño de las series de entrenamiento y predicción

d) Desarrollo y validación de los modelos ⁽⁶⁰⁾.

4.5. Efecto de los excipientes sobre la absorción de fármacos

Años atrás se consideraba que los excipientes eran entes seguros e inertes que no tenían actividad biológica ni interaccionaban con el sistema de absorción, sin embargo, en la actualidad se dispone de suficiente sustento científico para afirmar que los excipientes pueden alterar el vaciado gástrico y tránsito intestinal, desencadenar cambios en la membrana intestinal o en las uniones intercelulares y pueden afectar tanto a los transportadores como a los mecanismos metabólicos presentes en el tracto gastrointestinal. Por ello es de vital importancia para garantizar la seguridad y eficacia de los medicamentos que se considere el efecto que los excipientes pueden tener sobre el proceso de absorción de los fármacos.

Los cambios en el patrón de vaciado gástrico provocan cambios en la velocidad de absorción de fármacos; así, si algún factor aumenta la velocidad de vaciado gástrico, se iniciará antes la absorción de los fármacos y viceversa si se retrasa el vaciado gástrico. El bicarbonato de sodio provoca una mayor velocidad de absorción por aumento de la velocidad del vaciado gástrico ⁽⁶¹⁾, situación similar pero en menor medida ocurre con una solución de carboximetilcelulosa al 1 %. El vaciado gástrico se ve retrasado por efecto de la sacarosa ⁽⁶²⁾. Gracias a un estudio en rata se demostró que el Polietilenglicol 400 enlenteció marcadamente el vaciado gástrico. En el mismo modelo se demostró que por efecto de la hidroxietilcelulosa y la hidroxipropil- γ -ciclodextrina se redujo ligeramente este proceso ⁽⁶³⁾.

En las guías regulatorias actuales está sentado que quedan excluidas de bioexención aquellas formulaciones que contienen azúcares como el manitol o sorbitol a menos que el producto de referencia posea dichos excipientes en cuyo caso el genérico debe presentarlo en la misma cantidad que el innovador. Esto se debe a que quedó demostrado que el manitol, probablemente por efecto osmótico, provoca un aumento del peristaltismo ⁽²⁷⁾,

disminuyendo el tiempo de tránsito intestinal del fármaco que se administra de forma concomitante con dicho azúcar y provocando a su vez reducción tanto en los valores de AUC como de Cmax ⁽⁶⁴⁾. Este efecto del manitol es dosis dependiente; a mayor cantidad de manitol, menor es el tiempo de tránsito intestinal ⁽⁶⁵⁾. Otro excipiente que ha mostrado aumentar la motilidad intestinal es el polietilenglicol 400 ⁽⁶⁶⁾.

Algunos excipientes han mostrado efecto sobre la membrana intestinal ya sea por interacción con los lípidos de la membrana o por efecto sobre las uniones intercelulares ⁽⁶⁷⁾. En general, los tensoactivos tienden a incrementar la absorción de sustancias por las vías paracelular y transcelular debido a que reducen la viscosidad de la membrana incrementando, por tanto, su elasticidad ^{(68) (69)}. Un estudio realizado por Rege et al ⁽⁷⁰⁾ mostró que la permeabilidad del manitol, que se absorbe por la vía paracelular se ve aumentada por efecto del lauril sulfato de sodio. Los autores sugieren que esto es debido a que dicho excipiente puede provocar ruptura de la estructura intercelular. Asimismo, el EDTA aumenta la permeabilidad paracelular de fármacos que usan esta ruta por efecto sobre el calcio extracelular que regula las uniones intercelulares ^{(67) (71)}. Otro excipiente que mostró efecto sobre la membrana es el bicarbonato de sodio que modifica la interacción entre los fosfolípidos de la membrana y algunos principios activos como la fluvastatina sódica lo que provoca alteraciones en el transporte pasivo de este fármaco ⁽⁷²⁾.

La metil- β -ciclodextrina, el carboximetil almidón sódico, la hidroxipropilcelulosa con bajo número de sustituyentes y la croscarmelosa sódica demostraron aumentar la permeabilidad en yeyuno de rata de la 5(6)-carboxifluoresceína, que se absorbe por ruta paracelular, empleando el método de saco evertido ⁽⁷³⁾.

Los transportadores de absorción y secreción también pueden verse modulados por efecto de los excipientes ⁽⁶⁷⁾. Los tensoactivos, polímeros y compuestos de naturaleza lipídica son los excipientes más frecuentemente asociados a cambios en los transportadores de secreción intestinal ⁽⁷⁴⁾. En general, los tensoactivos pueden alterar la cara apical de los enterocitos y con ello se afecta el reconocimiento de sustratos, la unión entre la proteína

transportadora y el sustrato además de la actividad del ATP requerida para el transporte activo de absorción o secreción ⁽⁷⁵⁾. Bromberg y colaboradores ⁽⁷⁶⁾ demostraron que la permeabilidad de la doxorubicina puede incrementarse por efecto de los polímeros (poliacrilatos) que son capaces de acomplejar cationes como el zinc y el calcio, lo que inactiva ciertos transportadores de secreción.

La glicoproteína P (P-gp) probablemente es el transportador de secreción más estudiado del tracto gastrointestinal. Está codificado por genes que pertenecen al sistema de multiresistencia a fármacos (MDR) y se localiza en la membrana de borde de cepillo en las células del epitelio intestinal. Es un transportador inespecífico con afinidad por una gran variedad de fármacos. Los sustratos de la P-gp suelen ser moléculas con pesos moleculares entre 300 y 2000 Da y pueden ser ácidos, básicos o sin carga ⁽⁷⁷⁾. Algunos excipientes como los tensoactivos, polímeros y fosfolípidos han mostrado inhibir la P-gp lo que aumenta la absorción de fármacos que son sustrato de dicho transportador. Tensoactivos como Tween 20 ⁽⁷⁸⁾ y Tween 80 ⁽⁷⁹⁾ ⁽⁸⁰⁾ mostraron efecto inhibitorio de la P-gp. Dentro de los polímeros, PEG400 y PEG300 también inhiben la P-gp ⁽⁸¹⁾. Los fosfolípidos como el 1,2-dioctanoil-sn-glicero-3-fosfocolina y el 1,2-didecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina demostraron una importante acción inhibitoria de la P-gp ⁽⁸²⁾.

El transportador MRP2 es una proteína que se expresa en la membrana apical de los enterocitos; su expresión es más elevada en la región proximal del intestino y sus sustratos presentan una gran similitud con los de la P-gp, aunque no es total dicha similitud ⁽⁷⁷⁾. Excipientes que inhiben a la P-gp también tienen efecto sobre MRP2 tales como tensoactivos y polímeros. Ejemplo de ello son Kolliphor EL, Tween-80, lauril sulfato de sodio, PEG2000 y PEG 400 que han demostrado inhibir a MRP2 ⁽⁷⁹⁾ ⁽⁸³⁾ ⁽⁸⁴⁾. Además de estos excipientes de uso común, algunos lípidos han demostrado tener efecto inhibitorio sobre MRP2, tales como monolinoleato de glicerol, triglicéridos y caprilato de glicerilo ⁽⁸³⁾.

Otro transportador de secreción que se ve afectado por acción de excipientes es el BCRP.

Este transportador se encuentra en células del tracto gastrointestinal especialmente en yeyuno y se localiza en la membrana de borde de cepillo y, estudios realizados muestran que su actividad se modifica en presencia de tensoactivos como Kolliphor EL o Tween 20 ⁽⁸⁵⁾.

OATP es una proteína transportadora de absorción que se localiza en la cara apical de las células del epitelio intestinal cuyos sustratos son principalmente moléculas aniónicas anfipáticas de alto peso molecular y alto grado de unión a la albúmina. Una inhibición de este transportador provoca una disminución de la absorción de sus sustratos ⁽⁷⁷⁾. Algunos trabajos indican que Kolliphor HS15 y Kolliphor EL inhiben este transportador pero es necesario realizar más estudios para determinar qué otros compuestos pueden afectar la funcionalidad de esta proteína ⁽⁸⁶⁾.

El metabolismo intestinal es un mecanismo usado por el organismo para protegerlo de xenobióticos que consiste en la transformación bioquímica de una sustancia para su eliminación. Este proceso está mediado por enzimas y el mecanismo más importante a nivel intestinal es la oxidación mediada por el citocromo P450 (CYP450) cuyo resultado es la modificación química de xenobióticos haciéndolos más solubles (reacción de fase I de metabolismo). En la mucosa del intestino las enzimas de mayor importancia son CYP3A y CYP2C ⁽⁸⁷⁾. Los excipientes que más comúnmente interaccionan con el metabolismo intestinal son los tensoactivos. Kolliphor HS15, Kolliphor EL y Tween 80 pueden inhibir al CYP3A ⁽⁸⁸⁾. Asimismo, tienen efecto sobre esta enzima el PEG400 y Poloxamer 235 ⁽⁸⁹⁾. Kolliphor EL, Kolliphor RH40 y Tween 80 en un modelo *in vitro* mostraron inhibición de CYP3A4. Kolliphor EL, Kolliphor RH40 y Tween 80 mostraron inhibición de CYP2C9 ⁽⁹⁰⁾. Las ciclodextrinas modificadas a bajas concentraciones aumentan la actividad de CYP2C9 en 140 a 176% con respecto al control ⁽⁹¹⁾.

Vasconcelos y colaboradores ⁽⁹²⁾ consideraron que los riesgos asociados a los fármacos están bien establecidos y controlados garantizando de este modo su calidad, seguridad y eficacia,

sin embargo, los riesgos asociados a los excipientes usados para la obtención de las formas farmacéuticas, no suelen ser evaluados y la información que se tiene de ellos sobre su impacto en la biodisponibilidad de fármacos es limitada. Es por ello que propusieron el sistema de clasificación biofarmacéutico de excipientes que clasifica en cuatro clases a los excipientes en función del impacto que tienen sobre el metabolismo intestinal y el impacto sobre los transportadores de secreción expresados en el intestino. En la clase I están los excipientes que no tienen efecto sobre el metabolismo y los transportadores de secreción, a la clase II pertenecen aquellos excipientes que tienen efecto sobre el metabolismo pero no sobre los transportadores, en la clase III se encuentran aquellos excipientes que no tienen efecto sobre el metabolismo pero si afectan los transportadores y por último en la clase IV se ubican aquellos excipientes que afectan tanto el metabolismo como los transportadores. En la figura 2 se presenta el sistema de clasificación biofarmacéutico de excipientes propuesto por Vasconcelos y colaboradores con algunos excipientes que han sido clasificados por los mismos autores ⁽⁹²⁾.

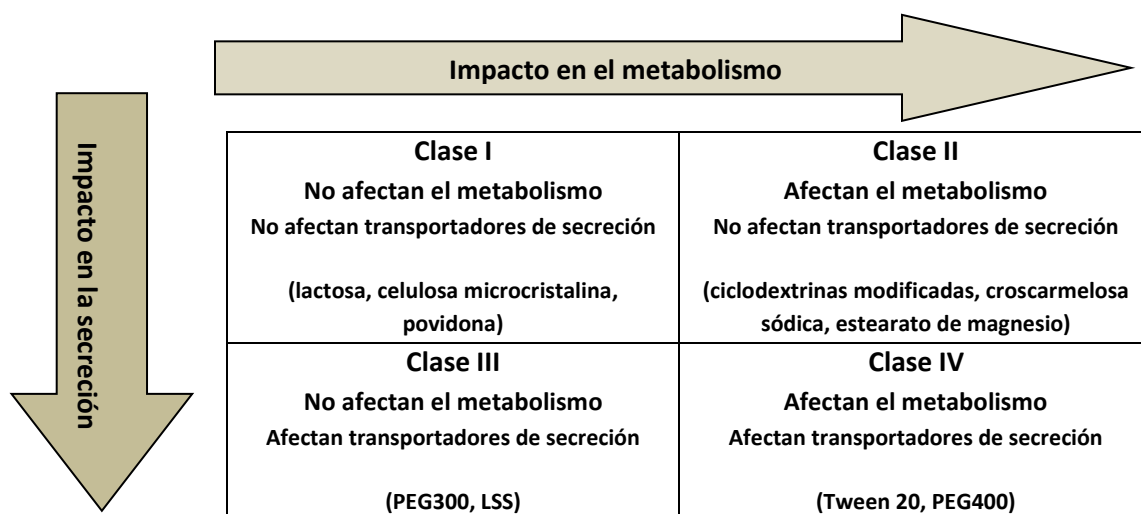


Figura 2: Sistema de clasificación biofarmacéutica de excipientes. Adaptada de ⁽⁹⁴⁾.

Los excipientes de la clase I presentan un bajo riesgo de afectar la seguridad y eficacia de los fármacos. Los de las clases II y III, presentan un alto riesgo, sobre todo si son empleados en formulaciones de fármacos que sufren metabolismo o son sustratos de los

transportadores de secreción. Los excipientes de la clase IV son los más críticos debido a que pequeños cambios en una formulación que los contenga puede tener importantes consecuencias en la seguridad y eficacia.

Esta clasificación puede resultar útil para evaluar los excipientes en función del efecto de los mismos sobre estas dos variables del proceso de absorción intestinal, sin embargo, no considera el efecto que pueden tener los excipientes sobre el vaciamiento gástrico, el tránsito intestinal y sobre la integridad de la membrana intestinal.

5. Ensayos de Disolución

El ensayo de disolución es una de las herramientas más importantes con las que se cuenta en todas las etapas de vida de un medicamento. Su incorporación a la Farmacopea de los Estados Unidos data desde 1970 y hasta la fecha se han incorporado nuevas metodologías y se han hecho más específicos los controles para cada forma farmacéutica y los procedimientos para calibrar los diferentes aparatos ⁽⁹³⁾.

Las farmacopeas de Estados Unidos, Europa y Japón han armonizado sus textos en el capítulo general de disolución y se han comprometido a no realizar ningún cambio unilateral al mismo ⁽⁹⁴⁾.

Las agencias regulatorias en la actualidad prefieren métodos de disolución discriminatorios que permitan detectar cambios en los atributos críticos de calidad. Los productos desarrollados bajo el enfoque de la calidad por diseño además de utilizar los principios del SCB requieren de modelos que permitan predecir su desempeño *in vivo* ⁽⁹⁵⁾ ⁽⁹⁶⁾.

El ensayo de disolución es una prueba de desempeño de las formas farmacéuticas que requieren demostrar que los principios activos son cedidos desde la formulación a un medio donde se disuelven. En control de calidad el ensayo de disolución permite garantizar la calidad del producto farmacéutico y la uniformidad de los lotes, permite además establecer y sustentar las especificaciones de los productos farmacéuticos y sirve como control de los

procesos de fabricación. Durante las etapas de diseño y desarrollo de nuevos productos, la velocidad de disolución *in vitro* puede relacionarse con el desempeño *in vivo* y por tanto la comparación de perfiles de disolución se utiliza como herramienta para predecir diferencias en la biodisponibilidad. De acuerdo a lo establecido en el SCB la velocidad de disolución permite sustentar bioexenciones ⁽⁹⁷⁾.

La velocidad de disolución está determinada por características intrínsecas del fármaco y factores inherentes a la formulación. La ecuación de Noyes y Whitney propuesta en 1897 define los factores que afectan la velocidad de disolución. Posteriormente Nerst y Brünner combinaron la ley de difusión de Fick con la ecuación propuesta por Noyes y Whitney obteniendo una expresión matemática que reúne los principales factores que determinan la velocidad de disolución ⁽⁹³⁾.

En la ecuación siguiente se pueden identificar los factores que determinan la velocidad de disolución $\delta C/\delta t$:

$$\partial C/\partial t = \frac{A \cdot D}{h} \cdot \frac{(C_s - C_t)}{V}$$

En donde,

A: área superficial efectiva de la partícula a disolver

D: coeficiente de difusión de la sustancia

h: espesor de la capa de difusión

($C_s - C_t$): representa el gradiente de concentración en la capa de difusión

V: volumen del medio de disolución ⁽⁹⁸⁾

De acuerdo a lo expresado en la ecuación anterior la velocidad de disolución viene determinada por características fisicoquímicas del fármaco, por las propiedades de la forma farmacéutica y por las condiciones del tracto gastrointestinal.

A continuación, en la tabla 2 se muestran las propiedades fisiológicas y de los fármacos que pueden influir en la disolución de los mismos y en consecuencia en su proceso de absorción.

Parámetro	Propiedades del fármaco	Parámetros fisiológicos
Coeficiente de difusión del fármaco (D)	Radio, masa y volumen molecular	Concentración de soluto, temperatura, viscosidad
Área superficial del fármaco (A)	Tamaño, forma y distribución de las partículas. Agregación particular	Hidrodinámica de los fluidos
Espesor de la capa de difusión (h)	Tamaño de las partículas, coeficiente de difusión	Velocidad de los fluidos, viscosidad, coeficiente de difusión
Concentración a saturación (C_s)	Solubilidad intrínseca (tamaño molecular, propiedades de los cristales, grupos químicos), pKa	Especie y capacidad del amortiguador, pH, presencia de productos lipolíticos, sales biliares y fosfolípidos, temperatura
Concentración del fármaco (C_t)	Dosis, solubilidad intrínseca (tamaño molecular, propiedades de los cristales, grupos químicos), pKa, permeabilidad intestinal	Volumen de los fluidos, absorción a través de la membrana intestinal, especie y capacidad del amortiguador, pH, presencia de productos lipolíticos, sales biliares y fosfolípidos, temperatura

Tabla 2: Características de los fármacos y parámetros fisiológicos que determinan la disolución de fármacos administrados y su absorción ⁽⁹⁹⁾

El ensayo de disolución puede realizarse en diferentes aparatos y la selección del mismo y de las condiciones del ensayo dependen de la forma farmacéutica y de las características del principio activo.

La especificación del ensayo de disolución como control de calidad generalmente consiste en evaluar el porcentaje de fármaco disuelto al final del ensayo con un único punto de muestreo. Durante el desarrollo, para evaluar cambios post registro y para demostrar equivalencia entre formulaciones es necesario caracterizar la curva de cinética de disolución y para ello es necesario cuantificar la cantidad de fármaco disuelto en el medio a diferentes tiempos de muestreo y construir la gráfica de cantidad de fármaco disuelto acumulado en función del tiempo. Estos gráficos se conocen como perfiles de disolución. Para comparar dos perfiles se emplea el factor de similitud (f_2) que calcula las diferencias entre la media del porcentaje disuelto de cada producto a comparar en cada intervalo de muestreo para proporcionar un solo número con el que se establece de manera cuantitativa la similitud

entre ambos perfiles. Si f_2 es mayor que 50 se considera que dos perfiles son similares y se espera que las dos formulaciones comparadas tendrán un desempeño *in vivo* similar. Si dos perfiles que se desean comparar, alcanzan un porcentaje de fármaco disuelto igual o mayor que 85% en los primeros 15 minutos, se considera igualdad en los perfiles y no se requiere el cálculo de f_2 ⁽⁹⁷⁾.

5.1. Aparatos de disolución I y II

De los aparatos de disolución descritos en las farmacopeas los más usados son el I (Aparato con canastilla) y el II (Aparato con paleta) cuya diferencia consiste en el elemento de agitación. En general los aparatos I y II constan de un vaso de vidrio o de otro material inerte y transparente, un motor y un eje metálico; en el caso del aparato I el eje metálico está acoplado a una canastilla cilíndrica y en el aparato II el eje usa una paleta. El eje y el sistema de agitación deben ser de acero inoxidable tipo 316 o cualquier otro material inerte.

El vaso es cilíndrico y de fondo semiesférico con un reborde en el extremo superior de las paredes; éste se mantiene parcialmente sumergido en un baño de agua o recibe calor de un dispositivo adecuado ya que la temperatura interior del vaso debe estar en $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante el ensayo. En cada vaso se coloca un volumen establecido de un medio de disolución que permite la disgregación y posterior disolución del fármaco. El motor mueve al eje y sistema de agitación en un movimiento rotatorio.

El procedimiento general para realizar un ensayo de disolución con estos aparatos consiste en colocar el volumen de medio de disolución en el vaso previamente desgasificado y equilibrar la temperatura del medio a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, posteriormente se coloca la unidad de dosificación a ensayar y poner en funcionamiento el aparato a la velocidad establecida. Si se requiere más de una muestra del medio durante el ensayo se recomienda reponer el volumen de medio retirado. Las muestras serán valoradas con un método analítico validado ⁽⁹⁴⁾.

La velocidad de disolución puede verse afectada por la configuración y funcionamiento del equipo de disolución, por ello es necesario un correcto diseño, calibración y validación del mismo y para ello deben considerarse los aspectos siguientes:

- Alineación del equipo o verificación de la verticalidad del eje y ubicación en el centro del vaso. Si un equipo está desalineado sus velocidades de agitación serán mayores que las de un equipo alineado.
- Altura del sistema de agitación que debe ser siempre la misma para evitar que la velocidad de agitación se modifique
- Regularidad en la superficie, forma interior del vaso y concentricidad de la forma esférica del fondo. Si alguno de estos aspectos se desvía de especificaciones puede provocar alteraciones en el flujo y por tanto aumenta la variabilidad de los resultados.
- Posición de la cánula. El muestreo manual puede arrojar resultados con alta variabilidad por una toma de muestra en diferentes puntos del vaso. El muestreo automatizado puede eliminar los problemas asociados a la toma de muestra ⁽⁹⁷⁾.
- Fuente de vibración. Al presentarse fuentes de vibración en el entorno cercano se generan errores en los ensayos de disolución ⁽¹⁰⁰⁾.

Para garantizar que los parámetro del diseño y desempeño de los equipos de disolución se encuentren bajo control se debe realizar una calibración mecánica en la que se evalúan la velocidad de agitación, altura de la paleta o cestillo, verticalidad del vaso, centrado del vaso y del eje, verticalidad y rotación del eje. Al evaluar estos parámetro críticos y obtener resultados adecuados, se garantiza que los resultados no están condicionados por el desempeño del equipo ⁽¹⁰¹⁾.

Hay factores inherentes al diseño del ensayo que pueden afectar la velocidad de disolución. Entre ellos se encuentran:

- a) Temperatura: el efecto de la temperatura sobre la velocidad de disolución es

directamente proporcional y un cambio en la temperatura puede afectar de forma significativa un ensayo de disolución ⁽¹⁰²⁾. El ensayo debe realizarse a 37°C para simular la temperatura fisiológica y este parámetro debe ser controlado durante todo el ensayo.

- b) Agitación e hidrodinámica: como se puede intuir la velocidad de disolución es directamente proporcional a la agitación. La hidrodinámica en los ensayos de disolución realizados en los aparatos I y II no corresponde a las condiciones *in vivo* y aunque se ha intentado relacionar los resultados *in vitro* con los *in vivo* no se han encontrado resultados consistentes. Con el aparato de paletas es importante considerar el efecto de cono que puede ocurrir en la parte inferior del vaso a modo de zona muerta que puede evitar que el medio de disolución se ponga en contacto con la forma farmacéutica y con ello enlentecer la velocidad de disolución ⁽¹⁰³⁾ ⁽¹⁰⁴⁾ ⁽¹⁰⁵⁾. El efecto de cono se ha observado en fármacos con alta y baja solubilidad aunque el efecto sea más notorio en los fármacos poco solubles ⁽¹⁰⁶⁾.
- c) Ubicación de la forma farmacéutica en el vaso: según la posición de la forma farmacéutica en el interior del vaso, la velocidad de disolución puede cambiar. Por la forma cónica del fondo del vaso no es sencillo ubicar en el mismo punto la forma farmacéutica y aunque se han propuesto estrategias para intentar disponer la formulación en un mismo lugar, no se ha podido validar ninguna de ellas ⁽¹⁰²⁾ ⁽¹⁰⁷⁾.
- d) Medio de disolución: sin duda alguna, el medio de disolución afecta de forma directa la velocidad de disolución, tanto por su naturaleza como por el volumen de medio empleado. El ensayo debe realizarse con un volumen que permita mantener las condiciones sumidero o sink. Las condiciones sink por definición están garantizadas si el volumen del medio es tres veces más que el necesario para obtener una solución saturada del fármaco a la dosis ensayada ⁽¹⁰⁸⁾. Es por ello que suelen emplearse entre 500 y 1000 mL de medio. Este volumen de medio no resulta

representativo de la realidad fisiológica pero *in vivo* se mantienen condiciones sink, producto del proceso de absorción que ocurre a todo lo largo del tracto gastrointestinal ⁽¹⁰²⁾. La composición del medio será descrita de forma detallada en un apartado a continuación.

- e) Desgasificación del medio: si el medio no está correctamente desgasificado, se puede producir una alta variabilidad intervaso e interensayo debido a que se pueden formar burbujas que se adhieren a la forma farmacéutica, modificando el patrón de disolución. El método ideal de desgasificación consiste en calentar el medio a 41°C y filtrar con vacío inmediatamente empleando vacío y a través de una membrana de tamaño de poro 0,45 µm. El sistema antes descrito debe ser adaptado a un dispositivo que permita agitación vigorosa del medio durante la filtración y ésta debe realizarse al menos por 5 minutos. El calentamiento previo puede ser obviado ya que la cantidad de gases disueltos al final del proceso no difieren de forma significativa de los medios que se calientan previamente ⁽¹⁰⁹⁾.

5.2. Aparato de disolución IV

Otro aparato descrito en las farmacopeas es el aparato IV (Celda de flujo) que se compone de un depósito y una bomba para el medio de disolución, una celda de flujo y un baño de agua que mantiene el medio de disolución a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. La bomba suministra un flujo constante cuyos estándares son 4 mL, 8 mL y 16 mL por minuto. La celda de flujo es de un material transparente e inerte. Ésta se coloca en forma vertical con un sistema de filtro para impedir que se escapen partículas no disueltas de la parte superior de la celda. La base de la celda es de forma cónica donde se coloca una perla de vidrio de 5 mm aproximadamente en el ápice y se llena con perlas de 1 mm para proteger el tubo de la entrada de fluido. A la celda se le acopla un dispositivo de alambre a modo de portacomprimidos.

Para realizar el ensayo se deben colocar las perlas de vidrio y la unidad de dosificación sobre el soporte de alambre. Se ensambla la tapa del filtro y se unen las partes mediante una

abrazadera adecuada. Empleando la bomba se introduce el medio de disolución previamente calentado a $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ a través del extremo inferior de la celda a la velocidad de flujo establecida previamente. El medio pasará a través de la celda y luego se recogerá el eluato en las fracciones de tiempo indicadas. Estas muestras se valoran con el método analítico validado correspondiente ⁽⁹⁴⁾.

5.3. Medios de disolución

Los medios de disolución descritos en las monografías para los diferentes principios activos tienen como objetivo el control de calidad y en muchos casos éstos no resultan representativos de las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal. Con miras a la investigación y a encontrar correlaciones del estudio de disolución *in vitro* con lo obtenido *in vivo*, es necesario desarrollar medios más complejos y representativos de la realidad fisiológica. A los medios que intentan simular las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal y que permiten predecir el comportamiento *in vivo* de las formulaciones empleando ensayos *in vitro* de velocidad de disolución, se les conoce como medios biopredictivos. El medio de disolución adecuado se selecciona de acuerdo al conocimiento científico y la experiencia; debe considerarse además de las características fisicoquímicas del fármaco, las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal ⁽¹¹⁰⁾. La solubilidad de los fármacos en la luz intestinal depende de los fluidos gastrointestinales, de allí la importancia de conocer la composición y las propiedades de los mismos. A continuación se describen las principales características de dichos fluidos a fin de contrastar éstas con las que se derivan de los medios biopredictivos.

- a) pH, capacidad amortiguadora y sistema tampón: El pH del tracto gastrointestinal varía a lo largo del mismo y éste juega un papel primordial en la disolución de los fármacos administrados por vía oral, especialmente cuando se trata de moléculas ionizables con un pKa dentro del rango de pH que se puede encontrar en condiciones lumenales. El pH varía en forma gradual a lo largo de todo el tracto gastrointestinal y va desde valores muy bajos en el estómago hasta pH básico en la

sección terminal del intestino. El pH es regulado por las concentraciones de iones hidronio; en el estómago se segrega ácido clorhídrico, por lo que el medio en este órgano es normalmente ácido. La concentración promedio de ácido clorhídrico en ayuno es de 0,01 a 0,1 M y en estado postprandial es entre 10^{-3} y 10^{-7} M. El bicarbonato, secretado por el páncreas y las células epiteliales del duodeno, es el sistema tampón responsable del gradiente de pH que se encuentra a lo largo de la luz intestinal. En duodeno y yeyuno la concentración de bicarbonato es de entre 2 y 30 mM en condiciones de ayuno. La capacidad amortiguadora depende del sistema, pKa y concentración del tampón, así como del pH del medio. La capacidad amortiguadora se expresa como mmol/L·pH y representa la cantidad de ácido o base fuerte que debe añadirse a un litro de solución tampón para producir un cambio de pH de una unidad ⁽¹¹¹⁾.

b) Bilis: La bilis es producida por el hígado, se acumula en la vesícula biliar y se libera al lumen intestinal; está constituida por sales biliares, fosfolípidos, bicarbonato, colesterol, pigmentos biliares y desechos orgánicos. La presencia de las sales biliares en la luz intestinal forma micelas con los lípidos y con ello se aumenta la solubilidad de los fármacos y al disminuir la tensión superficial se mejora la humectación de sólidos. Kalantzi y colaboradores señalaron que en condiciones de ayuno encontraron una concentración de sales biliares de 2,6 mM y en yeyuno de 2 mM ⁽¹¹²⁾.

c) Osmolaridad: La osmolaridad de los líquidos de la luz intestinal puede afectar tanto la liberación de fármacos como el comportamiento de los excipientes. En un estudio realizado por Kalantzi y colaboradores encontraron que el contenido gástrico en ayuno tiene una osmolaridad de 98 mOsm/Kg y 30 minutos después de la ingesta de alimentos es de 559 mOsm/Kg, pasando a 217 mOsm/Kg después de 210 min. ⁽¹¹³⁾. Clarysse y colaboradores encontraron que en la primera porción del intestino delgado los valores de osmolaridad oscilan entre 124 y 278 mOsm/Kg en ayunas y

entre 250 y 367 mOsm/Kg después de la alimentación. Otra observación de estos investigadores es la alta variabilidad en los valores de osmolaridad después de la ingesta de alimentos ⁽¹¹⁴⁾.

- d) Viscosidad: Los fluidos biológicos del tracto gastrointestinal y los alimentos triturados han mostrado un comportamiento no Newtoniano, revelando una disminución de la viscosidad con el aumento de la fuerza de corte. Su medición por tanto no resulta sencilla en los fluidos intestinales. Las comidas típicas han sido caracterizadas con viscosidades que oscilan entre 10 y 2000 cP y se ha demostrado que en la comida ingerida existe una rápida y significativa disminución de la viscosidad con el tiempo por dilución con los fluidos gástricos ⁽¹¹¹⁾.
- e) Tensión superficial: La tensión superficial afecta a la disolución ya que puede influir en el grado de humectación de las formas de dosificación; así, una alta tensión superficial conlleva a una disminución de la humectación. A nivel gástrico la tensión superficial es entre 41 y 46 mN/m en ayunas y entre 30 y 31 mN/m después de la ingesta de alimentos. En la primera porción del intestino, la tensión superficial es de 28 a 46 mN/m en ayunas y entre 27 y 37 mN/m después de los alimentos ⁽¹¹¹⁾.
- f) Volumen: La concentración de fármaco disuelto desde una forma farmacéutica dependerá del volumen del líquido en el tracto gastrointestinal. Si el volumen de líquido es tal que la posible concentración del fármaco supera su solubilidad, entonces solo una parte de la dosis original se disolverá. El volumen en el estómago se ve afectado por la cantidad de líquido que se ingiere, la cantidad y velocidad de secreciones, y la velocidad a la que se vacía el contenido hacia el intestino delgado. En el intestino delgado, por su parte, el volumen depende de la cantidad de líquido que ha sido vaciado desde el estómago, de la absorción de líquidos a través de la pared intestinal y del tiempo de tránsito intestinal ⁽¹¹¹⁾.

En la tabla 3 se muestran datos encontrados en la bibliografía sobre las propiedades de los fluidos presentes en el tracto gastrointestinal y que sirven de base para el diseño de medios biopredictivos. Para diseñar este tipo de medios se debe considerar que tanto el pH como la concentración y la especie amortiguadora deben ser similares a las encontradas *in vivo*. Por otro lado, lo ideal es que las sales biliares, electrolitos, enzimas y lípidos también sean lo más similares posible a los endógenos del tracto gastrointestinal ⁽¹¹⁵⁾.

		pH	Capacidad amortiguadora (mmol/L·pH)	Osmolaridad (mOsmol/Kg)	Tensión superficial (mN/m)	Viscosidad (cP)
Estómago	Ayuno	1-2,5	7-18	171-276	41,9-45,7	-
	Alimentos	4,4-5,4	14-28	217-559	30-31	10-2000
Duodeno	Ayuno	6,2	5,6	178	33,3-46,0	-
	Alimentos	5,2-6,2	18-30	250-367	32,2-36,7	-
Yeyuno	Ayuno	5,3-8,1	2,4-2,8	200-278	28-33,7	-
	Alimentos	6,1	13,2-14,6	-	27	-

Tabla 3: Propiedades de los fluidos en los diferentes tramos del tracto gastrointestinal en ayuno y posterior a la ingesta de alimentos ⁽⁹⁹⁾.

5.3.1. Medios de disolución establecidos en las Farmacopeas

a) Agua: El agua puede ser usada como medio predictivo si se considera que las formulaciones generalmente se ingieren con agua. En control de calidad es un medio ampliamente usado; cuando se usa agua como medio de disolución, ésta debe ser desgasificada de manera adecuada ⁽¹¹⁶⁾. Este medio puede cambiar sus características iniciales por efecto del fármaco y los excipientes presentes en la formulación a estudiar. Por otra parte, en el caso de fármacos de baja solubilidad, el agua puede no garantizar condiciones sink, que son necesarias para un estudio adecuado de comportamiento de una formulación ⁽⁹⁵⁾.

b) Soluciones amortiguadoras pH 1,2; 4,5 y 6,8: El pH es una de las propiedades mejor

caracterizadas del tracto gastrointestinal y es uno de los principales factores que determinan la solubilidad de los fármacos que se administran por vía oral. A continuación se presenta en la tabla 4 la composición de los medios descritos en las farmacopeas y que pueden ser útiles para simular las condiciones de pH de estómago (pH 1,2), duodeno (pH 4,5) y yeyuno (pH 6,8) ^{(94) (117)}.

pH	Sistema amortiguador	Concentración (mM)
1,2	Cloruro de sodio/Ácido clorhídrico	50
4,5	Acetato de sodio/Ácido acético	36,5
6,8	Fosfato monobásico de potasio	50

Tabla 4: Composición de los medios establecidos en las Farmacopeas a los pH representativos del tracto gastrointestinal.

c) Fluido gástrico simulado (SGF): Es el medio que mejor refleja las condiciones fisiológicas del estómago con respecto al sistema amortiguador pH 1,2. Este medio contiene por cada litro de agua 3,2 g de cloruro de sodio; 3,2 g de pepsina y 7 mL de ácido clorhídrico. El pH encontrado a nivel estomacal oscila entre 1,5 y 1,9 por lo que este medio difiere de las condiciones fisiológicas; si el fármaco a evaluar es una base débil poco soluble esa diferencia de pH podría sobreestimar la velocidad de disolución *in vivo*. Este medio puede ser preparado sin pepsina y se denomina SGF blanco.

d) Fluido intestinal simulado (SIF): En analogía al SGF, constituye el medio más similar a las condiciones del intestino delgado descrito en las Farmacopeas. Contiene 6,8 g de fosfato monobásico de potasio; 77 mL de hidróxido de sodio 0,2 N y 10 g de pancreatina en agua suficiente para 1000 mL; su pH es 6,8. Este medio puede ser preparado sin pancreatina y se conoce como SIF blanco.

5.3.2. Medios biopredictivos

Estos medios que intentan simular las propiedades y características del tracto gastrointestinal se originaron en la década de 1980 cuando se inició el estudio del efecto de los alimentos sobre el proceso de absorción de formulaciones de liberación controlada. Para

ello, se incorporaron a los medios de disolución ácido oleico, desoxicolato de sodio y leche ⁽⁹³⁾. Las características y propiedades del estómago son diferentes a la del intestino y en ambos segmentos del intestino el estado prandial también genera cambios en las características y propiedades. Todas esas variables son consideradas en el desarrollo de medios biopredictivos. En la actualidad se cuenta con medios biopredictivos que representan los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal, desde el estómago hasta el colon. Estos medios han resultado de gran utilidad sobre todo para predecir el comportamiento de formulaciones que contienen fármacos clase II. Estos medios tienen como característica que contienen sustancias que intentan simular la presencia de sales biliares y fosfolípidos (taurocolato y lecitina, respectivamente) para mimetizar las condiciones fisiológicas. A continuación se describe la composición y propiedades de los medios biopredictivos según la zona del tracto gastrointestinal que quieren simular.

a) Medios biopredictivos que simulan el estómago

En la tabla 5 se muestra la composición y propiedades del medio que simula el estómago en estado de ayuno (FaSSGF) y los medios que simulan las fases inicial (FeSSGF Inicial), media (FeSSGF Media) y tardía (FeSSGF Tardía) del estómago una vez se han ingerido alimentos. La diferenciación en las etapas del estado postprandial responde a la realidad fisiológica ya que el medio cambia en la medida en que se realiza la digestión y se produce el vaciamiento gástrico. La propuesta de medios “instantáneos” va orientada a simular dichos cambios. De los medios que simulan el estado postprandial el que mejor refleja el contenido promedio a nivel estomacal es el de la fase media ⁽¹¹⁸⁾. Los medios que simulan los fluidos gástricos en ayuno y después de la ingesta de alimentos permiten evaluar el comportamiento de disolución de fármacos, con o sin la presencia de alimentos, en formulaciones que permiten la disolución a nivel estomacal ⁽¹¹⁹⁾.

	FaSSGF	FeSSGF Inicial	FeSSGF Media	FeSSGF Tardía
Composición				
Taurocolato sódico (mM)	80			

Lecitina (mM)	20			
Pepsina (mg/mL)	0,1			
Cloruro de sodio (mM)	34,2	148	237,02	122,6
Ácido acético (mM)			17,12	
Acetato de sodio (mM)			29,75	
Ácido ortofosfórico (mM)				5,5
Hidrogeno fosfato de sodio (mM)				32
Leche/solución amortiguadora		1:0	1:1	1:3
Ácido clorhídrico/hidróxido de sodio c.s	pH 1,6	pH 6,4	pH 5,0	pH 3,0
Propiedades				
pH	1,6	6,4	5,0	3,0
Osmolaridad (mOsmol/Kg)	120,7	559	400	300
Capacidad amortiguadora (mEq/pH/L)	-	21,3	25	25
Tensión superficial (mN/m)	42,6	49,7	52,3	58,1

Tabla 5: Composición y propiedades de los medios FaSSGF, FeSSGF Inicial, FeSSGF Media y FeSSGF Tardía (120).

Se han propuesto otros medios para intentar simular el efecto de los alimentos a nivel gástrico. Algunos medios utilizan leche homogeneizada de vaca con alto contenido de grasa o Ensure Plus cuyo contenido reúne las propiedades fisicoquímicas establecidas por la FDA como comida estándar en estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para evaluar el efecto de los alimentos ⁽¹²²⁾.

b) Medios biopredictivos que simulan el intestino delgado

La composición y propiedades del medio que simula los fluidos del intestino delgado en condiciones de ayuno (FaSSIF) y en condiciones postprandiales (FeSSIF) se encuentran en la tabla 6. Al igual que con el FeSSGF, los cambios en el medio a través del tiempo después de

la ingesta de alimentos puede ser simulado a través de medios “instantáneos” por lo que en la misma tabla se pueden observar tanto la composición como las propiedades del fluido intestinal simulado en fase inicial (FeSSIF Inicial), en fase media (FeSSIF Media) y en la fase tardía (FeSSIF Tardía). Los medios inicialmente descritos fueron reformulados y se presentó una segunda generación de medios que son el fluido intestinal simulado en condiciones de ayuno versión 2 (FaSSIF-V2) y el fluido intestinal simulado posterior a la ingesta de alimentos versión 2 (FeSSIF-V2) cuyas características pueden observarse igualmente en la tabla 6. La principal diferencia entre FaSSIF y FaSSIF-V2 es la menor cantidad de lecitina que presenta el FaSSIF-V2. En el caso de FeSSIF, la segunda generación del medio (FeSSIF-V2) incluye dos componentes que simulan el proceso de digestión: monooleato de glicerilo y oleato de sodio; estos componentes mejoran notablemente la solubilidad y disolución de los fármacos poco solubles en agua. En diferentes estudios se ha demostrado que los medios FaSSIF y FeSSIF incrementan la solubilidad de diferentes fármacos en comparación a lo que arrojan los medios amortiguados acuosos; esto se debe a que los medios biopredictivos mejoran la humectación y permiten la solubilización micelar de aquellos fármacos poco solubles en agua ⁽⁹⁷⁾.

	FaSSIF	FaSSIF-V2	FeSSIF	FeSSIF Inicial	FeSSIF Media	FeSSIF Tardía	FeSSIF-V2
Componentes							
Taurocolato sódico (mM)	3,0	3,0	15	10	7,5	4,5	10
Lecitina (mM)	0,75	0,2	3,75	3	2	0,5	2
Hidrógeno fosfato de sodio (mM)	28,65						
Ácido acético (mM)	-		144				
Cloruro de sodio (mM)	105,85	68,62	173	145,2	122,8	51	125,5
Ácido maléico (mM)	-	19,12		28,6	44	58,09	55,02
Hidróxido de sodio (mM)	-	34,8	101	52,5	65,3	72	81,65

Monooleato de glicerilo (mM)	-			6,5	5	1	5
Oleato de sodio (mM)	-			40	30	0,8	0,8
Propiedades							
pH	6,5	6,5	5,0	6,5	5,8	5,4	5,8
Osmolaridad (mOsmol/Kg)	270	180	635	400	390	240	390
Capacidad amortiguadora (mEq/pH/L)	10	10	76	25	25	15	25
Tensión superficial (mN/m)	54	54,3	48	30,1	32,7	46,0	40,5

Tabla 6: Composición y propiedades de los medios FaSSIF, FaSSIF-V2, FeSSIF Inicial, FeSSIF Media, FeSSIF Tardía y FeSSIF-V2 ⁽¹⁰⁰⁾ ⁽¹²²⁾

La diferencia fundamental entre FaSSIF y FaSSIF-V2 es que la cantidad de lecitina en la versión 2 es menor.

c) Medios biopredictivos que simulan el colon

Con el desarrollo de formulaciones de liberación controlada que buscan mantenerse en colon se han desarrollado medios que simulan este tramo del tracto gastrointestinal. En la tabla 7 se encuentran la composición y propiedades de los dos medios publicados (SCoF1 y SCoF2). La diferencia está en que el medio denominado SCoF1 contiene un sistema de amortiguación del sistema fosfato y en el SCoF2 es acetato ⁽¹²¹⁾ ⁽¹²²⁾.

	SCoF1	SCoF2
Composición		
Cloruro de potasio (g)	0,2	
Cloruro de sodio (g)	8,0	
Fosfato de potasio monobásico (g)	0,24	
Fosfato de sodio dibásico (g)	1,44	

Ácido acético (g)		10,2
Hidróxido de sodio (g)		6,2
Agua desionizada c.s (L)	1	1,0
Propiedades		
pH	7,0	5,8
Osmolaridad (mOsmol/Kg)		295
Capacidad amortiguadora (mEq/pH/L)		29,1
Fuerza iónica		0,16

Tabla 7: Composición y propiedades de los medios SCoF1 (Fluido simulado de colon) y SCoF2 (Fluido simulado de colon 2)

d) Medios que contienen tensoactivos sintéticos

Los tensoactivos por efecto micelar aumentan la solubilidad y disolución de fármacos. Los medios biopredictivos antes descritos contienen sustancias que simulan las sales biliares y por ello son inestables, lo que limita su preparación al mismo día del ensayo y no se asegura la estabilidad del medio durante un ensayo de liberación controlada que supere las 24 horas ⁽¹²³⁾. Es por ello que se han desarrollado medios que contienen tensoactivos sintéticos como los propuestos por Taupitz y Klein que contienen laurilsulfato sódico y Tween 80. Estos autores compararon los perfiles de disolución de una formulación de un fármaco clase II en este medio y con los obtenidos en medios FaSSIF y FeSSIF, concluyendo que se pueden desarrollar medios con capacidad discriminatoria empleando tensoactivos sintéticos siempre que se estudie de manera detallada la cantidad del tensoactivo usado ⁽¹²⁴⁾. Sin embargo, para desarrollar un medio con capacidad discriminatoria empleando tensoactivos es necesario considerar las características del tensoactivo, fuerza iónica del medio y naturaleza del sistema amortiguador que dependerán para su selección, del fármaco a estudiar ⁽⁹⁵⁾. Es importante considerar además que en un estudio de disolución predictivo las micelas que producen las moléculas de tensoactivo imitan el efecto de las ácidos biliares en el intestino y ambas sustancias facilitan la difusión y el transporte del fármaco. Si se considera que en la disolución se combina el efecto de solubilidad y difusividad, el tamaño de la micela tiene un efecto sobre la velocidad de disolución, este efecto debe evaluarse cuando se estudien diferentes tensoactivos ⁽¹²⁵⁾.

e) Sistema amortiguador bicarbonato

El sistema amortiguador fisiológico es bicarbonato y es la razón por la que éste debería ser el sistema de elección para intentar simular las condiciones del lumen intestinal y predecir de este modo la disolución de formas farmacéuticas sólidas que se administren por vía oral.

El sistema amortiguador bicarbonato está conformado por el par conjugado bicarbonato-ácido carbónico. El ácido carbónico es un ácido débil de pKa 6,4 que produce de forma espontánea dióxido de carbono (gaseoso) cuando se encuentra en solución acuosa. En un sistema abierto, como el del aparato de disolución convencional, la pérdida del dióxido de carbono cambia la concentración del par conjugado y por tanto el pH de la solución amortiguadora. Ésta es la principal limitante a la hora de usar este sistema amortiguador en los estudios de disolución *in vitro* y la razón para que en su lugar se empleen sistemas fosfato y acetato para mantener el pH de los medios de disolución ⁽¹²⁶⁾.

Garbacs y colaboradores, propusieron un equipo de disolución que posee un sistema para monitorizar y ajustar el pH del medio usando bicarbonato como sistema amortiguador. En diferentes pruebas demostraron que al introducir mezclas de gases con diferentes presiones de dióxido de carbono o solo dióxido de carbono se puede ajustar el pH de soluciones de bicarbonato en un rango entre 5,5 y 8,4 ⁽¹²⁷⁾.

Al considerar que el sistema bicarbonato es el representativo de la realidad fisiológica se entiende el interés en el estudio de este sistema y encontrar correlación con los datos que se obtienen usando otros sistemas amortiguadores. En un estudio realizado por Liu y colaboradores se encontró que al evaluar diferentes materiales de recubrimiento la solución tampón a base de fosfato mostró perfiles de liberación rápidos mientras que el sistema bicarbonato mostró diferencias significativas en la liberación del fármaco y estos resultados se correlacionaron con los tiempos de disgregación ⁽¹²⁸⁾. En otro estudio

realizado por Krieg y colaboradores se correlacionó las disoluciones de ácidos y bases débiles en sistemas amortiguadores carbonato y fosfato y en dicho estudio se concluyó que para los ácidos débiles el sistema amortiguador fosfato a baja concentración (1-25 mM) puede resultar biopredictivo y comparable al efecto del sistema carbonato, mientras que para bases débiles se requieren concentraciones muy bajas de fosfato (por debajo de 2 mM) para lograr el mismo efecto. En definitiva, los autores recomiendan emplear bajas concentraciones en el sistema amortiguador fosfato para hacerlo más fisiológico y similar al bicarbonato ⁽¹²⁹⁾.

6. Correlaciones *In Vivo-In Vitro*

Una correlación *In Vivo-In Vitro* (CIVIV) es el establecimiento de una relación racional entre una propiedad biológica, o un parámetro derivado de concentraciones plasmáticas del fármaco producidas por una forma farmacéutica y una característica o propiedad fisicoquímica de la misma formulación. Las propiedades biológicas más usadas son C_{max} y AUC y la propiedad fisicoquímica más empleada es el comportamiento de la formulación en la prueba de disolución *in vitro*. La relación cuantitativa entre las dos propiedades, la biológica y fisicoquímica es la CIVIV. Dicho de otro modo, una CIVIV es un modelo matemático predictivo que describe la relación entre una propiedad *in vitro* de la formulación y una respuesta relevante *in vivo* ⁽⁹⁴⁾.

El objetivo principal cuando se desarrolla y valida una CIVIV es poder usar la prueba de disolución como sustituto de los estudios de bioequivalencia en humanos, lo que permite reducir los estudios de este tipo en las etapas de desarrollo y cuando se presenten cambios post-registro ⁽¹³⁰⁾.

El aumento de la comercialización e interés de formulaciones de liberación modificada, sobre todo las de liberación prolongada han aumentado el desarrollo de CIVIV, ya que la caracterización biofarmacéutica de formas de liberación controlada requiere el desarrollo de métodos de disolución que permitan monitorizar el comportamiento de disolución a lo

largo del tiempo a fin de garantizar el desempeño *in vivo* de la formulación y esto ha incrementado el desarrollo de CIVIV ⁽¹³⁰⁾. Para formas farmacéuticas de liberación inmediata, resulta conveniente caracterizar el principio activo según el SCB para saber de antemano si según la clase, es posible esperar el desarrollo de una CIVIV. En la tabla 8 se puede observar la posibilidad de desarrollar correlaciones según la clase en el SCB.

<p>Clase I</p> <p>Correlación IVIV si la velocidad de disolución es más lenta que el vaciamiento gástrico. Se espera una correlación limitada o ninguna</p>	<p>Clase II</p> <p>Correlación IVIV si la velocidad de disolución <i>in vitro</i> es similar a la velocidad de disolución <i>in vivo</i></p>
<p>Clase III</p> <p>La absorción depende de la permeabilidad. No se espera una correlación con la velocidad de disolución <i>in vitro</i></p>	<p>Clase IV</p> <p>Se espera una correlación limitada o ninguna</p>

Tabla 8: Posibilidad de desarrollar una correlación en función de la clasificación en el SCB de fármacos

Según la capacidad que tenga una CIVIV de reflejar la totalidad de la curva plasmática después de la administración de una formulación, se pueden diferenciar cuatro niveles de correlación:

Nivel A: es una relación punto a punto entre la disolución *in vitro* y la velocidad de entrada *in vivo* o velocidad de absorción del fármaco a partir de la formulación. Se considera que es el nivel más alto de correlación. En esta correlación los perfiles de disolución *in vitro* y la velocidad de entrada *in vivo* son comparables. La curva de entrada *in vivo* se obtiene por deconvolución del perfil plasmático.

La deconvolución puede lograrse mediante técnicas de balance de masa dependientes del modelo (procedimiento de Wagner-Nelson o método de Loo-Riegelman) o por deconvolución matemática independiente del modelo. Este nivel se suele lograr con sistemas de dosificación de liberación modificada con velocidades de liberación *in vitro* independientes de los medios de disolución y de las velocidades de agitación usados en el

aparato de disolución.

La superposición no es un requisito absoluto para una correlación Nivel A. Puede existir una relación matemática que permita relacionar la curva de disolución y absorción, siempre que con dicha relación se pueda predecir el perfil de nivel plasmático a partir de los datos de disolución.

Nivel B: esta correlación utiliza los principios del análisis del momento estadístico. El tiempo medio de disolución *in vitro* se compara con el tiempo medio de residencia o con el tiempo medio de disolución *in vivo*. En este nivel de correlación se emplean todos los datos *in vitro* e *in vivo*, pero ésta no es una correlación punto a punto. La correlación del nivel B no es única porque diferentes curvas *in vivo* pueden producir valores similares de tiempo medio de residencia.

Nivel C: en este nivel se relaciona un punto de muestreo de la curva de disolución con un parámetro farmacocinético tal como ABC, $C_{\text{máx}}$ o $T_{\text{máx}}$. Representa una correlación de un solo punto y no refleja la forma completa del perfil plasmático. Este nivel de correlación se usa sólo como una guía para el desarrollo de formulaciones y como procedimiento de control de calidad ya que no es capaz de predecir el comportamiento real de la formulación *in vivo* ⁽⁹⁴⁾.

Nivel C múltiple: esta correlación relaciona uno o varios parámetros farmacocinéticos de interés con la cantidad de fármaco disuelto en varios tiempos de muestreo del perfil de disolución ⁽¹³¹⁾.

7. Fármacos a estudiar

7.1. Candesartán cilexetilo

Candesartán es un antagonista del receptor de angiotensina II, selectivo para los receptores

tipo AT1 indicado para el tratamiento de la hipertensión o la insuficiencia cardíaca. El candesartán se administra en forma oral como candesartán cilexetilo que es un profármaco que se convierte en el metabolito activo candesartán durante la absorción en el tracto gastrointestinal ⁽¹³²⁾. En la figura 3 se puede observar la estructura del candesartán cilexetilo.

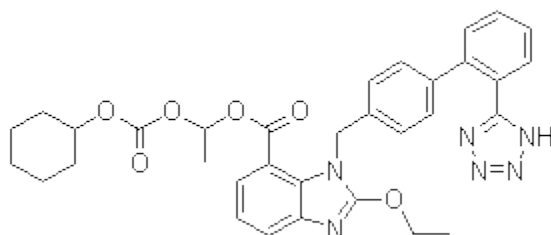


Figura 3: Estructura de candesartán cilexetilo

a) Propiedades fisicoquímicas

Físicamente es un polvo de color blanco a blanquecino moderadamente soluble en metanol y prácticamente insoluble en agua ⁽⁹⁴⁾. Es una molécula anfiprótica con dos grupos ionizables en condiciones de pH intraluminales. Posee un pKa 4,23 para la ionización ácida y un pKa de 1,45 para la ionización básica. El peso molecular del candesartán cilexetilo es 610,67 g/mol y punto de fusión de 163°C. Su log P estimado es de 7,53 ⁽¹³³⁾.

b) Propiedades farmacocinéticas

Dosis y presentación: La máxima dosis recomendada es 32 mg. Este fármaco se presenta en comprimidos con dosis de 4, 8, 16 y 32 mg.

Absorción y distribución: Tras la administración oral, el candesartán cilexetilo se convierte en el principio activo candesartán. La biodisponibilidad absoluta del candesartán es de aproximadamente un 40% después de la administración de una solución oral de candesartán cilexetilo. La biodisponibilidad relativa de los comprimidos en comparación con la misma solución oral es aproximadamente del 34%, con muy poca variabilidad. La biodisponibilidad absoluta estimada del comprimido es, por lo tanto, del 14%. La

concentración sérica máxima media (C_{max}) se alcanza a las 3–4 horas después de la toma del comprimido. Las concentraciones séricas de candesartán se incrementan linealmente con dosis crecientes en el intervalo de dosis terapéutico. No se observaron diferencias en la farmacocinética relacionadas con el sexo. El área bajo la curva (ABC) de la concentración sérica frente al tiempo del candesartán no se afecta significativamente por la comida.

El candesartán se une en gran proporción a las proteínas plasmáticas (más de un 99%). El volumen de distribución aparente del candesartán es de 0,1 L/Kg. ⁽¹³⁴⁾.

7.2. Valsartán

Valsartán (figura 4) es un agente antihipertensivo. Es un fármaco antagonista específico de la angiotensina II sobre los receptores AT₁. Puede usarse como un agente de primera línea para tratar la hipertensión no complicada, hipertensión sistólica aislada y la hipertrofia ventricular izquierda.

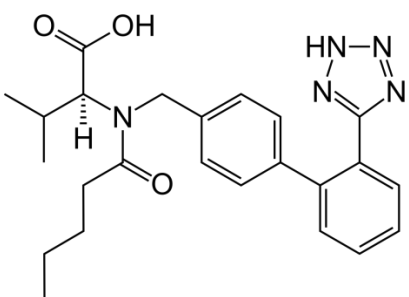


Figura 4: Estructura de valsartán

a) Propiedades fisicoquímicas

Valsartán es un polvo higroscópico blanco o casi blanco fácilmente soluble en etanol anhidro, moderadamente soluble en cloruro de metileno y prácticamente insoluble en agua ⁽⁹⁶⁾. Posee un peso molecular de 435,5 g/mol, un logP de 5,8 y un punto de fusión de 116-117°C. La molécula posee a pH del tracto gastrointestinal un grupo ionizable ácido y por

tanto se comporta como ácido débil con un pKa de 4,37 ⁽¹³⁵⁾.

b) Propiedades farmacocinéticas

Dosis y presentación:

Valsartan se presenta en comprimidos de 40 mg, 80 mg, 160 mg y 320 mg. La dosis máxima es de 320 mg.

Absorción y distribución:

Tras la administración oral de valsartán en monoterapia, se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas de valsartán en 2–4 horas con los comprimidos y 1–2 horas con la formulación de la solución. La biodisponibilidad absoluta media es del 23% y 39% con los comprimidos y la formulación de la solución, respectivamente. La comida reduce la exposición (medida por el ABC) de valsartán en un 40% aproximadamente y la concentración plasmática máxima (C_{máx}) en un 50% aproximadamente, aunque a partir de 8 horas después de la administración, las concentraciones plasmáticas de valsartán fueron similares en los grupos que recibieron la medicación en ayunas y con alimento. Sin embargo, este descenso del ABC no se acompaña de una disminución clínicamente significativa del efecto terapéutico, y por tanto valsartán puede administrarse con o sin comida.

El volumen de distribución de valsartán en estado estacionario tras su administración intravenosa es de unos 17 litros, lo cual indica que valsartán no se distribuye mucho a los tejidos. Valsartán presenta una elevada fijación a las proteínas séricas (94–97%), principalmente a la albúmina sérica ⁽¹³⁶⁾.

7.3. Clonazepam

Clonazepam es un agente anticonvulsivante que se usa para el tratamiento de convulsiones

miotónicas o atónicas, epilepsia fotosensible y crisis de ausencia. No suele ser efectivo en convulsiones tónico-clónicas generalizadas y parciales. El mecanismo de acción parece implicar la mejora de las respuestas del receptor gamma-aminobutírico. En la figura 5 se muestra la estructura del clonazepam.

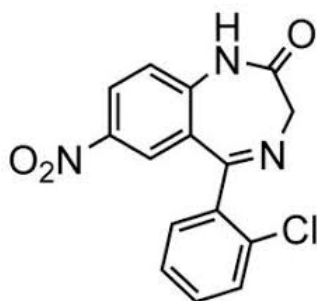


Figura 5: Estructura de clonazepam

a) Propiedades fisicoquímicas

Se trata de un polvo amarillo claro con un olor tenue. Es moderadamente soluble en acetona y en cloroformo, poco soluble en alcohol y éter; insoluble en agua ⁽⁹⁴⁾. Posee dos grupos ionizables (uno ácido y uno básico), sin embargo, a pH del tracto gastrointestinal solo se obtendrá el comportamiento del clonazepam como base débil con un pKa de 1,89. Tiene un peso molecular de 315,71 g/mol, un logP de 2,41 y un punto de fusión de 238-240°C ⁽¹³⁷⁾.

b) Propiedades farmacocinéticas

Dosis y presentación:

Clonazepam se presenta en comprimidos de 0,5 mg, 1 mg 2 mg y 2,5 mg.

Absorción y distribución:

Tras su ingestión, el clonazepam se absorbe de forma rápida y casi total. Las concentraciones plasmáticas máximas de clonazepam se alcanzan al cabo de 1-4 horas. La

biodisponibilidad absoluta por vía oral es del 90%. El tiempo de absorción medio es alrededor de 25 minutos.

Las concentraciones plasmáticas de clonazepam en estado de equilibrio para un régimen de dosificación de una vez al día, son tres veces más altas que las alcanzadas después de una única dosis oral. La relación de acumulación pronosticada para regímenes de dosificación de 2 y 3 veces al día fueron respectivamente 5 y 7. Las concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio tras dosis múltiples de 2 mg 3 veces al día por vía oral promediaron 55 ng/ml. La relación concentración plasmática-dosis de clonazepam es lineal. La concentración plasmática anticonvulsivante objetivo del clonazepam osciló de 20 a 70 ng/ml.

Clonazepam se distribuye muy rápidamente a los distintos órganos y tejidos con preferencia por la fijación a las estructuras cerebrales. El tiempo medio de distribución es de aproximadamente 0,5-1 hora. El volumen de distribución es de 3 L/Kg. Su grado de fijación a proteínas es del 82-86% ⁽¹³⁸⁾.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

1. Proceder a la caracterización biofarmacéutica de los principios activos seleccionados en base a estudios de solubilidad y permeabilidad.
2. Explorar la influencia en la permeabilidad intestinal de los excipientes incluidos en sus formulaciones farmacéuticas de manera individual y en su conjunto.
3. Desarrollar estudios de disolución de formulaciones farmacéuticas de los principios activos seleccionados en los medios requeridos para la obtención de bioexenciones (aparato USP II, 50 rpm, a los pH's 1,2; 4,5 y 6,8).
4. Desarrollar estudios de disolución de las formulaciones farmacéuticas de los principios activos seleccionados en métodos modificados (aparato USP IV) y/o con medios biorrelevantes.
5. Ensayar el efecto de los excipientes incluidos en formulaciones farmacéuticas sobre la solubilidad de los fármacos.
6. Determinar si los resultados *in vitro* corresponden con los observados en los estudios de bioequivalencia para las formulaciones ensayadas.
7. Desarrollar correlaciones *in vivo-in vitro* de tipo C y si fuera posible de tipo A con los medios de disolución

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Compuestos y productos ensayados

1.1. Candesartán cilexetilo

Principio activo (patrón): fue proporcionado por un laboratorio farmacéutico.

Las formulaciones bioequivalente A y bioequivalente B (con respecto al producto de referencia) fueron proporcionadas por los laboratorios farmacéuticos fabricantes. El producto de referencia (R) (Atacand, Astrazeneca, S.A.) fue adquirido en una farmacia local. Los comprimidos ensayados del producto de referencia y los de las formulaciones A y B declaran 32 mg de fármaco.

1.2. Valsartán

Principio activo (patrón): fue donado por un laboratorio farmacéutico.

Las formulaciones C y D fueron suministradas por el laboratorio farmacéutico fabricante de los mismos. El producto de referencia (R) (Diovan, Novartis S.A.) fue adquirido en una farmacia local. Los comprimidos ensayados de todas las formulaciones estudiadas declaran 320 mg.

1.3. Clonazepam

Principio activo (patrón): fue dispensado por un laboratorio farmacéutico.

La formulación No-bioequivalente (Formulación F) fue proporcionada por un laboratorio farmacéutico. El producto de referencia (R) (Clonazepam 1 mg, Ravotril, Roche S.A.) fue donado por Roche S.A. El producto de referencia (E) (Clonazepam 0,5 mg, Rivotril, Roche

S.A.) fue adquirido en una farmacia local. Los comprimidos de las formulaciones R y F declaran 1 mg, mientras que los comprimidos de la formulación E declaran 0,5 mg. Por ello, en todos los ensayos de la formulación E se utilizaron dos comprimidos, con objeto de llegar a la potencia de 1 mg.

2. Técnicas experimentales

2.1. Concentración de saturación

Con la finalidad de calcular el número de dosis (Do) se determinó la concentración de saturación a 37 °C en cada uno de los pH de referencia (1,2; 4,5 y 6,8). También se determinó la concentración de saturación de cada fármaco con cada uno de los excipientes de sus respectivas formulaciones, para analizar el efecto en la solubilidad de cada uno de estos. Además se determinó la concentración de saturación de los fármacos a partir del producto terminado.

2.1.1. Soluciones de trabajo

- Tampón cloruro 50 mM pH 1,2
- Tampón acetato 36,5 mM pH 4,5
- Tampón fosfato 50 mM pH 6,8
- FaSSGF
- FaSSIF
- Agua

Todas las soluciones tamponadas se prepararon según lo establecido en la EP.

2.1.2. Técnica experimental

Se colocaron cantidades exactamente pesadas de la sustancia activa en tubos Pyrex de 12 mL de cierre hermético con tapón recubierto de teflón y se le agregó la solución de trabajo

correspondiente. Se agitó durante 3 minutos en un vortex Genic 2 Scientific Industries y a continuación fueron introducidos en el agitador orbital termorregulado (Stuart orbital incubator SI50) a 37 °C programado a 100 movimientos oscilantes por minuto. A lo largo del ensayo se verificó la presencia de sólido no disuelto y así se garantizó que la solución se encontraba en condición de saturación. El pH de las soluciones fue medido a lo largo del ensayo (pHmetro Crison pH-Meter Basic 2+), no requiriendo ningún ajuste.

En los ensayos con excipientes se colocaron cantidades pesadas de la sustancia activa más la cantidad de excipiente equivalente a un comprimido y se le agregó agua como solvente de trabajo. Luego se procedió de la misma forma descrita anteriormente. Los productos terminados de las formulaciones fueron pulverizados y posteriormente dispersos en agua. A continuación se procedió de la misma forma descrita anteriormente.

2.1.3. Tratamiento de las muestras

Se tomó cada muestra al finalizar el ensayo a las 24 horas y se centrifugaron a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos. Del sobrenadante se tomó un volumen conveniente que fue diluido a fin de evitar la precipitación del fármaco durante la cuantificación. La dilución fue realizada con la misma solución de trabajo con la que se realizó el ensayo de solubilidad. Para la cuantificación de cada muestra se utilizó el método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) adecuado y el cálculo de solubilidad fue realizado por interpolación en la curva de calibrado de los valores de área obtenidos para cada muestra.

2.2. Ensayo de disgregación

Este ensayo tiene por objetivo determinar si la forma farmacéutica se disgrega dentro de un lapso de tiempo especificado en las condiciones del producto terminado, sin embargo, la disgregación no implica disolución completa del principio activo. Se utilizó el equipo disgregador PTZ-S marca Pharma-Test, el cual cumple con todas las especificaciones de la EP. Está constituido por un sistema de calentamiento controlado por termostato y una

bomba de circulación de agua. El ensayo se realizó a 37°C dentro de un vaso precipitado de 1000 mL. La cesta de disgregación que sostiene los tubos de vidrio con los discos, tiene una distancia de 55 mm, con un golpeteo de 30 veces por minuto. Para la realización del ensayo se utilizaron las condiciones estándar en un vaso precipitado de 1000 mL de agua destilada con una velocidad de 30 golpes por minuto. Se colocó un comprimido en cada uno de los seis tubos de la cesta y se verificó que todos los comprimidos habían disgregado completamente en un tiempo límite de 5 minutos.

2.3. Perfiles de disolución

2.3.1. Aparatos de disolución y condiciones de los ensayos

En el presente estudio se emplearon los aparatos II y IV de disolución, descritos en la EP.

El aparato II de disolución usado fue el Pharma-Test PT-DT70 acoplado a un sistema de muestreo automático constituido por una bomba peristáltica ISMATEC IPC y un colector de fracciones Pharma-Test PTFC-2 que permite retirar de cada vaso de disolución un volumen nominal de 5 mL y reponer dicho volumen en los tiempos programados para la toma de muestras. En el sistema de toma de muestras se dispuso de un filtro de polietileno con tamaño de poro 10 µm (Pharma-Test) en cada vaso, que evitó la extracción de partículas no disueltas. El equipo fue programado a una velocidad de 50 r.p.m y la temperatura fue de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Los tiempos de toma de muestra para los perfiles de candesartán, valsartán y clonazepam fueron de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos. Para la realización de los perfiles en este aparato se emplearon 900 mL de medio de disolución en cada vaso. El medio, una vez desgasificado, mediante filtración al vacío a través de membrana filtrante Millipore tipo HNWP de nylon de 0,45 µm con agitación magnética por 5 minutos, se colocó en el vaso de disolución y se comprobó que la temperatura fuera 37 °C y se midió el pH en

cada vaso (permitiéndose un error de $\pm 0,05$). Posteriormente, se colocó una unidad posológica en cada vaso de disolución (procurando ubicación del comprimido en el centro del vaso) y se inició el ensayo al comenzar la agitación. Al finalizar el ensayo se midió nuevamente el pH de cada vaso.

Se empleó el aparato IV Erweka Flow-Through-cell DFZ-720 constituido con una bomba de pistón HKP-720 acoplado a un sistema de muestreo FRL724 que colecta muestras por intervalos de tiempos programados de cada celda de flujo y disponía de una membrana filtrante de celulosa de poro 10 μm que se colocó al final de la celda, que impide la extracción de partículas no disueltas. Para la realización de los perfiles en el aparato IV el equipo fue programado a una velocidad de 8 mL/min para lo cual se preparó la cantidad suficiente de medio de disolución para todo el sistema y la temperatura fue de 37 °C. Los tiempos de toma de muestra para los perfiles de candesartán, valsartán y clonazepam fueron de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos. El cambio de pH 1,2 a pH 4,5 se realizó en el minuto 15 del ensayo y el cambio de pH 4,5 a pH 6,8 en el minuto 30 del ensayo. En medios de disolución FaSSGF+FaSSIF el cambio de medio se realizó en el minuto 15 del ensayo.

Los medios de disolución ensayados se muestran en la tabla N° 9.

pH	Composición	Concentración (mM)
1,2	Cloruro de sodio/ácido clorhídrico	50
4,5	Acetato de sodio/ácido acético	36,5
6,8	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico	50
6,8	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico	10
6,5	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico / Tween 20 0.10 %	50
6,5	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico / Tween 20 0.10 %	50
6,5	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico / Tween 20 0.15 %	50
6,5	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico / Tween 20 0.20 %	50

6,5	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico / Tween 20 0.30 %	50
6,5	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico / LSS 0.10 %	50
6,5	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico / LSS 1 %	50
1,2	Cloruro de sodio/ ácido clorhídrico / Tween 20 0.20 %	50
4,5	Acetato de sodio/ ácido acético / Tween 20 0.20 %	36,5
6,8	Fosfato diácido de potasio/ ácido fosfórico / Tween 20 0.20 %	50
6,5	FaSSGF	50
6,5	FaSSIF	50

Tabla 9: Medios ensayados en los perfiles de disolución

Las muestras obtenidas en los diferentes ensayos de disolución realizados a las formulaciones de candesartán, valsartán fueron valoradas por CLAR con detección de fluorescencia y clonazepam con detección UV. La cantidad disuelta a cada tiempo de muestreo, de todos los fármacos estudiados fue calculada por interpolación en una curva de calibrado de los valores de área obtenidos para cada muestra.

2.3.2. Prueba de comparación

Con la finalidad de determinar que la velocidad de disolución del fármaco desde una formulación test es similar a la de un producto de referencia, se comparan los perfiles de disolución obtenidos mediante el factor de similitud. El factor de similitud, f_2 , es el parámetro matemático propuesto en la guía de la EMA y en la guía de la FDA; y es un parámetro independiente del modelo cinético de la disolución que mide la similitud en el porcentaje de disolución entre las dos curvas. La expresión matemática del factor de similitud es la siguiente:

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - E_t)^2 \right]^{-0,5} * 100 \right\}$$

donde n es el número de pares de puntos que se comparan, R_t es el porcentaje de fármaco

disuelto desde la formulación de referencia a cada tiempo y T_t es el porcentaje de fármaco disuelto desde la formulación test a cada tiempo. Para el cálculo del factor de similitud se debe emplear un número de puntos tal que incluya sólo el primer valor mayor del 85% de la cantidad máxima disuelta para cualquiera de las dos formulaciones. Si f_2 es mayor o igual que 50 indica que las curvas son similares. Sólo en los casos en que a los 15 minutos se ha disuelto al menos el 85% del fármaco, se considera que los perfiles de disolución son similares sin necesidad de hacer cálculos matemáticos.

2.4. Ensayo de permeabilidad en animales

2.4.1. Animales de experimentación

Los animales usados en este estudio fueron ratas albinas macho de raza Wistar procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche (núcleo San Juan). Los ensayos fueron autorizados por el comité de bioética de la misma universidad (UMH-DI-MBS-02-14). Los animales se mantuvieron en perfectas condiciones de higiene y climatización y recibieron una dieta equilibrada. Para los ensayos se seleccionaron animales con edades entre dos y tres meses. Tras 4 horas de ayuno, su peso osciló entre 250 y 320 g.

2.4.2. Soluciones de trabajo

A continuación se describen las soluciones empleadas en los ensayos *in situ*.

2.4.2.1. Solución anestésica

Para llevar a cabo la intervención quirúrgica previa a los ensayos de perfusión *in situ*, se requiere anestesia general profunda del animal. A tal efecto se empleó una solución de pentobarbital sódico (Eutanax inyectable) comercial de concentración 200 mg/mL. A partir de esta solución se preparó la anestesia que se administró por vía intraperitoneal en proporción 1:10 en solución B. De esta solución se administró una dosis de 0,15 mL por cada 100 g de peso del animal, lo que equivale a 30 mg de pentobarbital sódico por Kg de animal.

2.4.2.2. Soluciones de lavado intestinal

Solución de Lavado A

Es una solución isotónica que permitió eliminar restos de quimo que pudieran quedar en la luz intestinal. Su composición es:

NaCl	9,00 g
KCl	0,34 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,19g g
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	0,76 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1 L

Solución de Lavado B

Es una solución de suero fisiológico regulada a pH 7,00 mediante una solución de tampón fosfato según Sörensen a razón de 10 mL de tampón por litro de solución. Se empleó para acondicionar la mucosa intestinal antes de realizar los ensayos de absorción. La composición de esta solución es:

NaCl	9,00 g
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O 1/15 M	3,9 mL
Na ₂ HPO ₄ 1/15 M	6,1 mL
H ₂ O destilada c.s.p.	1 L

Soluciones de Perfusión

Con el objeto de comparar el efecto de las formulaciones sobre la absorción de los principios activos estudiados, se prepararon soluciones con los productos a razón de dosis en 250 mL, ya que los estudios de bioequivalencia en humanos se realizan dándole al voluntario la dosis con un vaso de agua. En general, para preparar las soluciones de trabajo de cada una de las formulaciones estudiadas se pesó una cantidad exacta equivalente a la dosis del principio activo a partir de tres comprimidos previamente pulverizados y posteriormente dispersos en solución de lavado B y las soluciones resultantes fueron sometidas a ultrasonidos durante 10 minutos. Se prepararon además soluciones que contenían solo el principio activo (soluciones patrón); para prepararlas se pesaron las cantidades de patrón estándar necesario para obtener la misma concentración de trabajo empleando solución de lavado B para su disolución. La solución resultante fue sonicada durante 10 minutos. Las concentraciones finales se pueden observar en la tabla N° 10.

Compuesto	Pesada equivalente del principio activo (mg)	Concentración de la solución de trabajo (mg/mL)
Candesartán cilexetilo	32	0,064
Valsartán	320	0,16
Clonazepam	1	0,004

Tabla 10: Pesadas de principios activos y concentraciones de las soluciones de trabajo usadas en el ensayo de permeabilidad en animales

Para estudiar el efecto de los excipientes sobre la permeabilidad se prepararon soluciones agregando una cantidad pesada exacta de excipiente a razón de un comprimido en 250 mL a la solución patrón con la sustancia activa. La solución resultante fue sonicada durante 10 minutos.

2.4.3. Técnica experimental en intestino delgado completo

La técnica de experimentación utilizada es una modificación de la propuesta por Doluisio y colaboradores. El animal se sometió a un periodo de ayuno de 2-4 horas, permitiéndole el acceso libre a agua para garantizar su hidratación. Tras anestesiarse el animal y comprobar

que ha alcanzado el grado de anestesia profunda necesaria, se procedió a colocarlo en posición decúbito supino sobre el tablero quirúrgico y se inmovilizó por las extremidades con cinta adhesiva sin que adquiriera una posición forzada. Posteriormente se descubrió la cavidad abdominal mediante sección de la piel, desde 2 cm por encima del poro genital hasta 1 cm del apéndice xifoides. A continuación se separaron los rectos abdominales cortando por la línea alba. El siguiente paso consistió en localizar el duodeno, en el que desemboca el conducto biliar; este conducto debe ligarse para evitar que se produzca un ciclo enterohepático en caso de que el fármaco se excretara por la bilis al intestino.

A continuación, se practicó un pequeño corte en bisel en el extremo duodenal. Se introdujo el extremo de una cánula de vidrio acodada y se fijó al intestino. El otro extremo de la cánula se conectó mediante un tubo de polietileno, a una llave de tres pasos tipo Stopcock (figura 6). A su vez, ésta encajó a rosca con una jeringa de 10 mL de capacidad, que se fijó, mediante una pinza a un soporte vertical.

Posteriormente, se localizó el otro extremo (íleo-cecal) y se efectuó una incisión de forma que se proceda sin dificultad a la limpieza de la mucosa, mediante el paso por la jeringa conectada y a través del intestino de las soluciones de la solución de lavado A, termostatadas a 37°C, tantas veces como fue necesario hasta que la mucosa quedó libre de residuos y de sales biliares (aproximadamente 50 mL).

Una vez que finalizó el lavado, se conectó otra cánula en el extremo final y se lavó con el líquido de lavado B. Luego esta cánula se unió a su vez a una llave de tres pasos y a otra jeringa. Todo el conjunto se sujetó a un soporte vertical, con la ayuda de unas pinzas. Por último se bombeó aire a través del intestino en ambas direcciones con la finalidad de eliminar los restos de la solución de lavado B.

Un factor a considerar es la posible desecación de la cavidad abdominal. Con objeto de evitarla se colocó en ella pequeños volúmenes de suero fisiológico atemperado a 37°C y se cubrió con una torunda de algodón empapada en el mismo líquido.




<p>Jeringa-exterior</p> <p>Permite el paso de solución o aire desde la jeringa al exterior.</p>	
<p>Jeringa-intestino</p> <p>Permite el paso de solución o aire desde la jeringa al intestino o viceversa.</p>	
<p>Intestino-exterior</p> <p>Permite el paso de solución o aire desde el intestino al exterior.</p>	

Figura 6: Esquema de las tres posiciones de la llave de tres pasos de tipo Stopcock

Para la realización del ensayo se perfundieron 10 mL de la solución a ensayar, previamente atemperada a 37°C. Cuando toda la solución estaba dentro del intestino delgado, se puso en marcha el cronómetro.

La toma de muestras se realizó cada 5 minutos alternativamente por cada una de las jeringas. La primera muestra se tomó por la jeringa distal y la última por la proximal. Se obtuvo un total de 6 muestras (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min) de 200 µL de solución cada una.

Las muestras obtenidas se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido de cada muestra se inyectó en el cromatógrafo líquido de alta resolución (CLAR) por duplicado.

2.4.4. Ensayo de reabsorción de agua

Existe un proceso de reabsorción de agua simultáneo al proceso de absorción de la sustancia ensayada de modo que la solución remanente en el lumen se concentra y puede quedar falseado por exceso.

Para corregir la concentración de las muestras se realizó el ensayo de reabsorción de agua, para ello, después de tomar la última muestra, se desconectó la cánula de la jeringa íleo-cecal y se colocó en un tubo de centrifuga de 15 mL. Con la jeringa que quedó conectada, se tomó aire y se ejerció presión para extraer el líquido remanente a través de la cánula. Seguidamente se cortó el mesenterio y se separó el asa intestinal del resto del animal. Una vez aislado el intestino, se presionó desde el principio hasta el final para asegurar que se había vaciado completamente. Finalizado el ensayo, el animal se sacrificó usando el mismo compuesto que en la anestesia: pentobarbital sódico (se administró por vía intraperitoneal una dosis de 90 mg/Kg).

El volumen recogido se centrifugó durante 10 minutos a 5.000 r.p.m. y con ello se sedimentó en el tubo de muestra los restos de mucosa arrastrados, se retiró el residuo y se midió el volumen que ocupa el sobrenadante. Para calcular el volumen final, se le adicionó a este valor, el volumen recogido durante la toma de muestras.

Para estimar las concentraciones reales de compuesto se calculó el volumen remanente a cada tiempo de toma de muestra. El volumen varía con el tiempo según una cinética de orden cero y por tanto la ecuación diferencial del proceso y su forma integrada son:

$$\frac{\partial V}{\partial t} = -k_0$$

$$V = V_0 - k_0 \cdot t$$

Siendo V el volumen remanente en el intestino a cada tiempo; V_0 , el volumen remanente a tiempo inicial y k_0 , la constante de velocidad de reabsorción de agua (mL/ min).

Mediante regresión lineal por mínimos cuadrados de los volúmenes obtenidos, se obtienen los parámetros V_0 y k_0 , con los que se determinan los volúmenes teóricos para cada tiempo de muestra (V_t). Con los valores de V_t se corrigen los valores experimentales de las concentraciones de soluto en las muestras, E , y se calcula la concentración remanente en lumen, C , con la siguiente ecuación:

$$C = E \frac{V_t}{V_0}$$

2.4.5. Cálculo de la constante aparente de la velocidad de absorción

Las constantes aparentes de velocidad de absorción se han determinado a partir siguiente modelo:

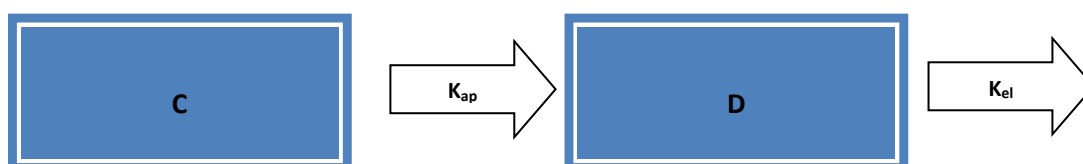


Figura 7: Modelo para determinar la constante aparente de absorción. Compartimiento C: . Lugar donde se produce la absorción (intestino). Compartimiento D; organismo

La desaparición del compuesto del compartimiento C se debe únicamente a la absorción y durante los 30 min que dura el ensayo sigue una cinética aparente de primer orden que se describe con la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -K_{ap} \cdot C$$

donde C corresponde a la concentración remanente de fármaco en el intestino y K_{ap} , a la constante de velocidad de absorción aparente de primer orden. Su forma integrada es:

$$C = C_0 \cdot e^{-K_{ap} \cdot t}$$

donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y C_0 , la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción ($t=0$). El valor de C_0 obtenido es siempre menor que la concentración perfundida debido a varios procesos simultáneos: dilución con el poco volumen que pudiese quedar de la solución de lavado, adsorción a la membrana intestinal y entrada rápida del compuesto en los enterocitos. El descenso de C_0 se debe mayoritariamente a la carga de la sustancia en la mucosa, cuyo equilibrio se alcanza en los primeros minutos de la perfusión y pasados 5 minutos el proceso ha finalizado totalmente. Por esta razón, la toma de muestras se inicia a ese tiempo.

Para obtener un valor representativo de la constante de velocidad de absorción, el ensayo se realizó en un mínimo de cuatro animales para cada solución ensayada, con lo que se obtiene un valor medio representativo.

2.5. Valoración de muestras

2.5.1. Método cromatográfico

Para el análisis de las muestras de los estudios realizados se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección por fluorescencia (candesartán y valsartán) y ultravioleta (clonazepam). El sistema cromatográfico utilizado ha sido un Sistema Alliance™ HPLC, que consta de los siguientes módulos:

- Bomba cuaternaria e inyector automático integrado Módulo de Separaciones Waters™ 2695

- Detector de absorbancia Waters™ 2487 doble λ
- Detector programable de fluorescencia Waters 2475
- Registrador-integrador Empower™

En cuanto a las condiciones cromatográficas, se utilizó una fase estacionaria inversa compuesta por una precolumna Phenomenex™ KJ0-4282, con dos filtros de 2 μm y relleno con micropartículas C-18 de 40 μm de tamaño y una columna de acero inoxidable Waters™ modelo Nova Pak C-18 de 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4 μm . Las otras condiciones cromatográficas se escriben a continuación según el fármaco analizado:

Candesartán cilexetilo:

- Fase móvil: mezcla en proporción volumétrica 60:40:0,2 de acetonitrilo y solución acuosa de tampón fosfato 0,02 M y trietilamina, respectivamente.
- Flujo: 1,0 mL/min
- Temperatura de la columna: 30°C
- Tiempo de retención: 4,5 minutos
- Detección: Fluorescencia, excitación 250 nm; emisión 375 nm

Valsartán:

- Fase móvil: mezcla en proporción volumétrica 75:25 de acetonitrilo y solución acuosa de ácido trifluoroacético 6,5 mM, respectivamente.
- Flujo: 1,0 mL/min
- Temperatura de la columna: 30°C
- Tiempo de retención: 3,5 minutos
- Detección: Fluorescencia, excitación 250 nm; emisión 375 nm

Clonazepam:

- Fase móvil: mezcla en proporción volumétrica 40:30:30 de agua: metanol: acetonitrilo.
- Flujo: 1,3 mL/min
- Temperatura de la columna: 30°C
- Tiempo de retención: 3,5 minutos
- Detección: Ultravioleta, 254 nm

Todos los componentes de la fase móvil fueron filtrados mediante un filtro Millipore GVWP de 0,22 µm de tamaño de poro antes de añadirse al sistema cromatográfico, para eliminar posibles partículas en dispersión.

3. Validación de los métodos analíticos

Para la determinación de la concentración de compuesto en las muestras se parte de la premisa de que el área del cromatograma es proporcional a la cantidad de compuesto presente en dicha muestra.

Para establecer la concentración de compuesto en las muestras se construyeron curvas de calibración, siendo necesario establecer la linealidad del modelo, la precisión y exactitud del método analítico y los límites de detección y cuantificación.

3.1. Ensayo de linealidad

Se determinó la linealidad en un rango entre el 1 y 110 % (10 puntos) de la concentración de trabajo, para lo que se utilizó reactivo estándar de los fármacos en estudio. Cada concentración se midió por duplicado.

- Curva de Calibración

Se pesaron con exactitud 10 mg de reactivo estándar USP y se disolvieron en Dimetilsulfóxido (DMSO) y se realizaron diluciones de la misma para abarcar todo el rango de concentraciones.

La curva de regresión se obtuvo mediante el método de los mínimos cuadrados, se calculó el intercepto y la pendiente, mediante la siguiente ecuación:

$$y = ax + b$$

Donde, a es la pendiente y b el intercepto, y es el área del pico en el cromatograma y x es la concentración (mg/mL).

En la tabla N° 11 se observan los parámetros y criterios de aceptación que se consideraron para establecer la linealidad.

Parámetros	Criterios de Aceptación
Coeficiente de correlación lineal (r^2)	$\geq 0,99$
Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f)	$\leq 2\%$

Tabla 11: Criterios de aceptación para linealidad

3.2. Ensayo de exactitud

Se determinó mediante el uso de soluciones de estándares de los fármacos en estudio en tres niveles de concentración del analito, a 10, 50 y 100%, dentro del rango de trabajo. Se realizaron 3 soluciones de cada nivel, buscando evaluar niveles de concentración inferior, medio y superior del intervalo de linealidad establecido. Se informó el porcentaje de recuperación total obtenido. Esto permite expresar la proximidad entre el valor que se acepta como referencia y experimental.

En la tabla N° 12 se observan los parámetros y criterios de aceptación que se consideraron para establecer la exactitud.

Parámetros	Criterios de Aceptación
Porcentaje de recuperación (%R)	95 – 105%
Desviación estándar relativa (CV%)	≤ 2%

Tabla 12: Criterios de aceptación para exactitud

3.3. Ensayo de precisión

Se evaluó la repetibilidad y la precisión intermedia, lo que permitió comprobar que los resultados son próximos entre sí y reflejó los errores aleatorios producidos al utilizar un método. Se analizaron por sextuplicado tres niveles de concentración 5, 50 y 100%.

Para la repetibilidad se prepararon las tres concentraciones con pesadas independientes cada una, las cuales fueron procesadas el mismo día de su elaboración. Para evaluar la precisión intermedia se compararon los resultados obtenidos en la repetibilidad con los obtenidos al preparar tres concentraciones con nuevas pesadas independientes al día siguiente del análisis anterior (empleando las mismas concentraciones de la repetibilidad); los análisis se realizaron manteniendo las mismas condiciones. A continuación se observan el parámetro y criterio de aceptación para establecer repetibilidad y precisión intermedia

(tabla 13):

Parámetro	Criterio de Aceptación
Coeficiente de variación (CV%)	$\leq 2\%$

Tabla 13: Criterios de aceptación para precisión

3.4. Ensayo de estabilidad

Se preparó una solución correspondiente al estándar del 100 % que fue la muestra estudio y se analizó por sextuplicado el día de su preparación (tiempo cero), 24 horas, 48 horas. Las muestras fueron almacenadas entre los tiempos de análisis en condiciones de refrigeración (5°C) y sobre bancada o temperatura ambiente (20°C), ambas condiciones protegidas de la luz y humedad.

Esto permite verificar la estabilidad de la muestra y estándares desde su preparación hasta la finalización del análisis.

En la tabla N° 14 se observan el parámetro y criterio de aceptación que se consideraron para establecer la estabilidad.

Parámetro	Criterio de Aceptación
Porcentaje de recuperación (%R)	98-102%

Tabla 14: Criterios de aceptación para estabilidad

3.5. Ensayo de influencia de filtro

Se verificó que el filtro utilizado no influye reteniendo al analito presente en la solución estándar y muestra estudio, evaluando el porcentaje de recuperación.

En la tabla N° 15 se observan el parámetro y criterio de aceptación que se consideraron para establecer influencia de filtro.

Parámetros	Criterios de Aceptación
Porcentaje de recuperación (%R)	98-102%

Tabla 15: Criterios de aceptación para influencia de filtro

3.6. Ensayo de especificidad

Se realizó una lectura del solvente DMSO, manteniendo las condiciones en las cuales se prepara y cuantifica la muestra. Se leyó también el estándar por separado a la concentración de trabajo. Esto permitió conocer el grado de respuesta del método y si el mismo responde únicamente al analito y está libre de interferencias. La interferencia no debe ser mayor a un 2%.

3.7. Ensayo de robustez

Se elaboró una muestra de solución estándar al 100 % de la concentración de trabajo y se procedió a realizar ensayos, según diseño factorial completo de 4 ensayos, evaluando 1 parámetro (tailing) y 2 factores (flujo y composición del medio de disolución, diluyente).

Se calculó el efecto de cada factor que tiene sobre el parámetro en estudio y su intervalo de confianza, que debe incluir el cero, para que el error no sea significativo.

3.8. Límite de detección y cuantificación

Se estableció el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{m}$$

$$LC = \frac{10 \cdot \sigma}{m}$$

en las que σ es la desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta de regresión y m es la pendiente de la misma.

4. Métodos matemáticos y estadísticos

4.1. Análisis de regresión

Se empleó un análisis lineal simple por mínimos cuadrados para determinar la constante de velocidad de reabsorción de agua, así como las rectas de calibración para la valoración del fármaco. Los cálculos se realizaron con el programa Excel.

El análisis por regresión no lineal simple se realizó en Excel utilizando la Herramienta Solver. Se aplicó para la determinación de las constantes de velocidad de absorción aparentes (K_{ap}) en cada condición experimental.

4.2. Pruebas de comparación de medias

Se han utilizado pruebas paramétricas, dado que se cumplen las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas entre los grupos. Además las observaciones son independientes, es decir, el valor de una observación en un grupo no proporciona información sobre el valor de la observación en otro grupo.

Las pruebas paramétricas de comparación entre medias que se han realizado en este trabajo fueron las siguientes:

4.3. Análisis de varianza global: ANOVA de un factor

Este análisis se realiza para detectar diferencias significativas entre las constantes de absorción aparentes (K_{ap}) obtenidas en las diferentes condiciones. Se seleccionó un nivel de

confianza del 95%.

4.4. Prueba de comparación múltiple: Prueba de Scheffé

Esta prueba se basa en comparar todos los grupos de valores uno por uno con todos los demás de forma independiente, para poder así establecer las diferencias significativas entre dos grupos de datos. Se seleccionó un nivel de significación $\alpha=0,05$.

5. Correlación *In vivo-In vitro*

El objetivo de realizar la CIVIV fue evaluar si los perfiles *in vitro* son capaces de predecir el comportamiento *in vivo* de formulaciones de candesartan estudiadas. Para ello se siguió el método en dos pasos, empleando el modelo dependiente de Loo-Riegelman para calcular las fracciones absorbidas *in vivo* y el modelo de Weibull para calcular las fracciones disueltas *in vitro*.

5.1. Modelo de Loo-Riegelman

El modelo de Loo-Riegelman es un modelo de balance de masas empleado para describir fármacos que se comportan de forma bicompartimental cuando se administran por vía extravasal y permite calcular la constante de absorción (k_a) y las fracciones absorbidas (f_a) a distintos tiempos. En este modelo se considera el lugar de absorción y se asume que el organismo está dividido en dos compartimientos, uno central y uno periférico, por lo que la distribución no es instantánea ni homogénea ⁽¹³⁹⁾.

La ecuación que se muestra a continuación describe la variación instantánea de concentración en el compartimento central de un fármaco bicompartimental administrado por vía extravasal:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = (k_a \cdot A) - (k_{12} \cdot C) + (k_{21} \cdot P) - (k_{el} \cdot C)$$

En donde k_a es la constante de absorción, k_{12} es la constante de distribución a compartimento periférico, k_{21} la constante de retorno al compartimento central, A es la concentración de fármaco en la zona de absorción, C es la concentración del fármaco en el compartimento central y P es la concentración del fármaco en el compartimento periférico y k_{el} es la constante de eliminación.

La concentración absorbida a tiempo t (A_t) es igual a la suma de la concentración presente en el compartimento central (C_t), la concentración en el compartimento periférico (P_t) y la concentración eliminada hasta ese tiempo (E_t), según la siguiente ecuación:

$$A_t = C_t + P_t + E_t$$

Las concentración de las muestras plasmáticas del ensayo de bioequivalencia corresponden a las concentraciones de fármaco en el compartimento central a cada tiempo (C_t).

Para calcular la concentración en el compartimento periférico (P_t) se empleó la siguiente ecuación:

$$P_t = k_{12} \cdot e^{-k_{21} \cdot t} \cdot \int_0^t C \cdot e^{k_{21} \cdot t} \cdot \partial t$$

La concentración eliminada en cada tiempo (E_t) se calculó según la ecuación:

$$E_t = k_{el} \cdot AUC_t^0$$

En la ecuación antes presentada se ha de asumir que la cantidad de fármaco absorbida a tiempo infinito es igual a la cantidad de fármaco eliminado a tiempo infinito.

Posteriormente se calculó la fracción absorbida a cada tiempo, empleando para ello la ecuación siguiente:

$$f_a = \frac{A_t}{A_{\infty}} \cdot 100$$

La representación del perfil f_a en función del tiempo permite comprobar que el fármaco sigue un modelo bicompartimental extravasal si dicho perfil aumenta gradualmente hasta alcanzar una asíntota.

5.2. Modelo de Weibull para ajustar los perfiles de disolución

Con la finalidad de describir los perfiles de disolución se ajustó el modelo matemático de Weibull a los datos de disolución. Posteriormente los parámetros de este modelo se emplearon para calcular las fracciones de fármaco disueltas (f_{diss}) a los tiempos que se requieren para los cálculos posteriores. La ecuación de Weibull se describe a continuación:

$$f_{diss_t} = f_{diss_{max}} \cdot \left(1 - e^{\left(-\frac{t^a}{b}\right)}\right)$$

5.3. Correlación en dos pasos

Para realizar una correlación con este método se debe, en principio, en una misma gráfica representar los perfiles de absorción (f_a vs t) y los perfiles de disolución (f_{diss} vs t) de todas las formulaciones para verificar si ambos perfiles son superponibles; de ser así, se puede establecer directamente la correlación. Generalmente ocurre que los perfiles no resultan superponibles debido a que el proceso de absorción es más largo que la duración del ensayo de disolución, por lo que se hace necesario ajustar el tiempo mediante el método de Levy Plot que permite escalar los tiempos de disolución *in vitro* haciéndolos coincidir con los de la absorción *in vivo*.

El método de Levy Plot permite encontrar una ecuación que relacione los tiempos *in vivo* con los tiempo *in vitro* en los que las fracciones absorbidas y las fracciones disueltas sean iguales. Para realizarlo se tomaron como modelo las fracciones absorbidas y con la ecuación del modelo de Weibull de disolución *in vitro* se calcularon los tiempos en los que se

obtendrían esas fracciones disueltas. Posteriormente se construyó una gráfica con los tiempos *in vivo* en el eje X frente a los tiempos *in vitro* en el eje Y encontrándose la relación entre dichos tiempos según la siguiente ecuación:

$$t_{vitro} = a + b \cdot t_{vivo}$$

Con la ecuación anterior se escalan los tiempos *in vitro* y se procede a modelar los perfiles de disolución empleando el modelo de Weibull obteniéndose el perfil de $t_{escalado}$ - f_{diss} .

Una vez escalado el tiempo se puede establecer la CIVIV para lo que se relacionaron la fracción absorbida y la fracción disuelta a los mismos tiempos, usando como referencia los tiempos del ensayo de bioequivalencia *in vivo*. La representación gráfica de las fracciones disueltas calculadas en función de las fracciones absorbida permite hallar la relación entre ambas fracciones.

Una correlación lineal puede ser descrita según la siguiente ecuación:

$$f_a = a + b \cdot f_{diss}$$

Posteriormente se evaluó el grado de predictibilidad de la correlación que fue establecida mediante una validación interna calculando el porcentaje de error de predicción (%EP) para Cmax y AUC de cada una de las formulaciones usadas para desarrollar la correlación. El cálculo del error de predicción se realiza según la siguiente ecuación:

$$\%EP = \frac{(Experimental - Predicho)}{Experimental} \cdot 100$$

Para considerar que una correlación es válida, es necesario que se cumplan las siguientes condiciones:

- El %EP individual de cada formulación para cada parámetro es menor que 15%
- El %EP medio de todas las formulaciones para cada parámetro es menor que 10%
-
- Los pasos a seguir para evaluar los resultados de la validación interna de una

correlación son:

- 1) Se calcula las f_a predichas a partir de los valores de f_{diss} usados en la correlación empleando la ecuación de la CIVIV.
- 2) Reconvolver los perfiles predichos de f_a -t a los perfiles de C_p -t empleando las ecuaciones que se muestran a continuación:

- $A_{t_pred} = \frac{f_{a_pred}}{100} \cdot A_{\infty}$
-
- $P_{t_pred} = P_{t-1_pred} \cdot e^{-k_{21} \cdot \Delta t} + \frac{k_{12}}{k_{21}} \cdot C_{t-1_pred} \cdot (1 - e^{-k_{21} \cdot \Delta t}) + \frac{k_{12}}{2} \cdot \Delta C_{pred} \cdot \Delta t$
-
- $C_{t_pred} =$

$$\frac{A_{t_pred} - P_{t_pred} \cdot e^{-k_{21} \cdot \Delta t} + C_{t-1_pred} \cdot k_{12} \cdot \frac{\Delta t}{2} - C_{t-1_pred} \cdot \frac{k_{12}}{k_{21}} \cdot (1 - e^{-k_{21} \cdot \Delta t}) - C_{t-1_pred} \cdot k_{el} \cdot \frac{\Delta t}{2} - AUC_{t-1_pred}^0 \cdot k_{el}}{1 + k_{12} \cdot \frac{\Delta t}{2} + k_{el} \cdot \frac{\Delta t}{2}}$$
-
- 3) Se selecciona el valor de C_{max} del perfil predicho de C_p -t y se calcula el AUC del nuevo perfil.
- 4) Se calcula el %EP promedio e individual comparando los valores de C_{max} y AUC del ensayo de bioequivalencia *in vivo* y los valores de los parámetros predichos.
- 5) Evaluar los resultados y compararlos con las especificaciones para decidir si la CIVIV es válida.
-
-
-

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

1. Candesarán cilexetilo

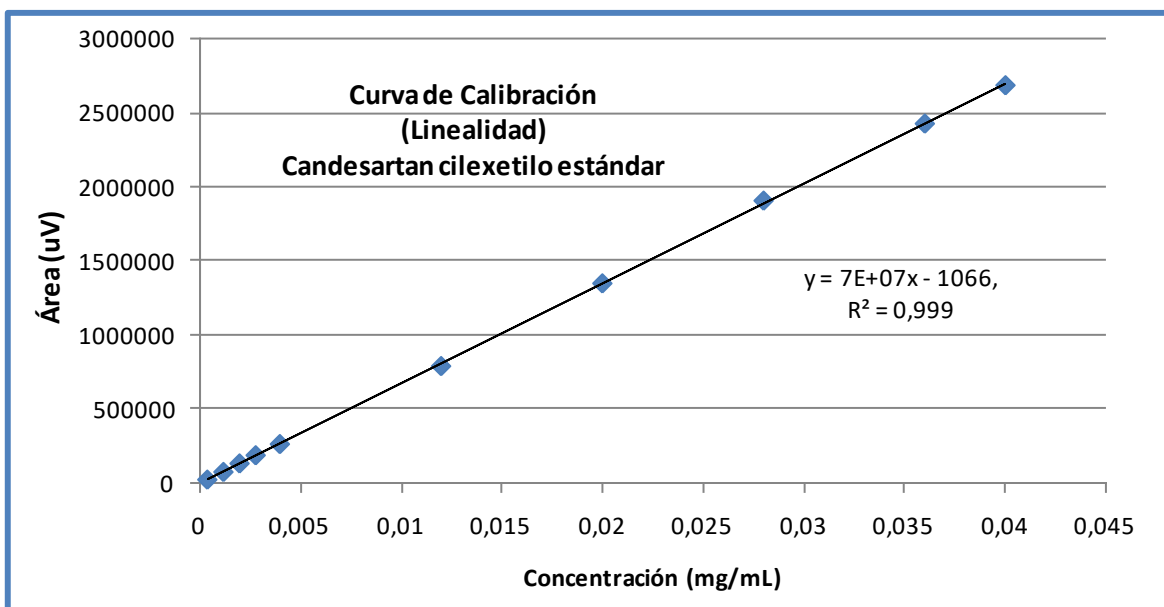
1.1. Validación del método analítico para candesarán cilexetilo

1.1.1. Linealidad

Se realizó el estudio de linealidad a la curva de calibración utilizada. A continuación se muestra en la gráfica N° 1 la linealidad y en la tabla N° 16 los datos de este análisis.

Linealidad	Criterios de aceptación			
Coeficiente de correlación r	0,99996			
Coeficiente de determinación r ²	0,99992		Cumple r ² ≥ 0,99	
Error típico S _{y/x}	10068			
Nº determinaciones	10			
Pendiente	67468471,7			
Intercepción eje Y	-1066,6			
DE del intercepto S _a	4520,2			
t de student (n-2)	2,3			
Límite de detección	0,0002			
Límite de cuantificación	0,0007			
Media ± DE (factores de respuesta)	6727307355 ± 88938808			
CV % factores de respuesta	1,3			Cumple CV % ≤ 2%
Intervalo de confianza del intercepto eje Y	10423,6	Valor min.	Valor máx.	Cumple: Intervalo de confianza del intercepto incluye el cero
		-11490,3	9357	

Tabla 16: Resultados de la prueba de linealidad y criterios de aceptación para candesarán cilexetilo



Gráfica 1: Curva de calibración candesartán cilexetilo, linealidad

1.1.2. Exactitud

En la tabla N° 17 se muestran los promedios de errores relativos y porcentaje de recuperación de los tres niveles de los ensayos.

Exactitud	Nivel 1 (5%)	Nivel 2 (50%)	Nivel 3 (100%)	Criterios de aceptación	
Er	1,1	0,1	0,2	$Er \leq 2$	Cumple
% Recuperación	99,8	100,2	100,7	% R: 95-105	Cumple

Tabla 17: Resultados de la prueba de exactitud y criterios de aceptación para candesartán cilexetilo

1.1.3. Precisión (repetibilidad) y precisión intermedia

En la tabla N° 18 se muestran los CV % de la repetibilidad.

Exactitud	5%	50%	100%	Criterios de aceptación	
% CV	1,4	0,8	0,2	$CV \% \leq 2$	Cumple

Tabla 18: Resultados de los análisis de repetibilidad para candesartán cilexetilo

Para la precisión intermedia se aplicó el “Test de comparación de medias” (t-student y test

de Cochran) de las mismas concentraciones. Como las varianzas son iguales se realizó el test de student (tabla N° 19).

Puntos	5%		50%		100%	
Parámetros	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Media	100,45	100,78	99,89	100,12	101,48	101,21
Varianza	0,07	0,07	0,05	0,04	0,28	0,34
Comparación de Varianzas						
F crítico (tabla)	4,28		4,28		4,28	
F calculado	1,0350		1,250		1,214	
Varianza común	0,0722		0,0450		0,310	
Varianzas iguales						
Estadístico t exp.	0,7806		0,5511		0,5778	
Valor crítico de t (2 colas)	2,2281		2,2281		2,2281	
Calificación t	Cumple		Cumple		Cumple	

Tabla 19: Resumen de parámetros y comparación de varianzas para la aplicación del test de comparación de medias en el análisis de precisión intermedia para candesartán cilexetilo

1.1.4. Estabilidad

Las muestras que se almacenaron a temperatura ambiente (bancada) y refrigeradas a las 24 y 48 horas se compararon contra las muestras recién preparadas. En la tabla N° 20 se muestran los resultados de estabilidad.

Estabilidad	Día 1		Día 2		
Temperatura	5°C	20°C	5°C	20°C	
% Recuperación	100,2	99,85	99,92	99,55	Cumple

Tabla 20: Resultados de la prueba de estabilidad para candesartán cilexetilo

1.1.5. Influencia de filtro

Se realizó una prueba con una solución al 100% para ver la influencia de filtro; el porcentaje de recuperación fue de un 99,6%, por lo tanto **Cumple**.

1.1.6. Especificidad

La metodología cuantifica al principio activo específicamente y es selectivo, siendo la interferencia menor a un 2%, por lo tanto **Cumple**.

1.1.7. Robustez

Se evaluó si el método es robusto dentro de los rangos establecidos de prueba, basándose en cambios de dos factores analíticos seleccionados, mediante una matriz factorial.

El parámetro fue el tailing y los factores modificados fueron flujo y composición del medio.

Para cada factor se calculó el efecto que tiene y debe tener un intervalo de confianza del 90%, que se calcula con la DE y la t de student, que incluya al cero para que el efecto no sea significativo. En la tabla N° 21 se presentan los resultados de robustez.

Factor	Efecto (Tailing)	IC (factor $\pm t^*/\sqrt{n}$)	
Flujo	-0,01	0,0002 – (- 0,0302)	Cumple
Composición del medio	-0,02	0,0102 – (- 0,0202)	Cumple

Tabla 21: Resultados de la prueba de robustez para candesartán cilexetilo

1.2. Concentración de saturación de candesartán cilexetilo

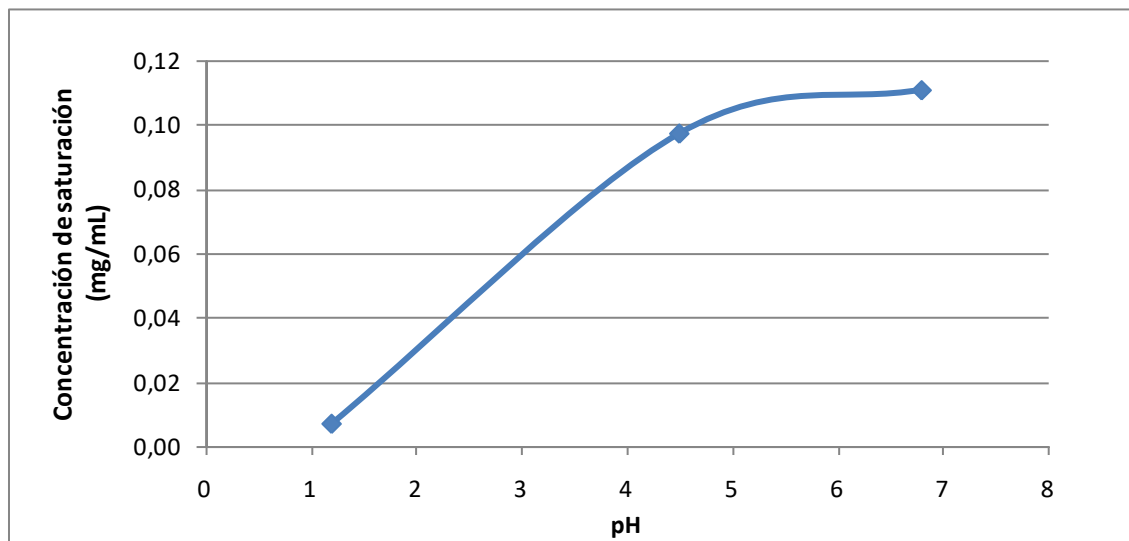
1.2.1. Medios de disolución biofarmacéuticos

En la tabla N° 22 se muestran las concentraciones experimentales de candesartán individualmente y promedio en condición de saturación a cada pH estudiado en 24 horas.

En la gráfica N° 2 se muestra el perfil de solubilidad-pH.

pH	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
1,2	0,0069	0,0071	0,0005	6,69	18,10
	0,0067				
	0,0076				
4,5	0,0969	0,0974	0,0004	0,44	1,31
	0,0977				
	0,0975				
6,8	0,1117	0,1109	0,0010	0,89	1,15
	0,1112				
	0,1098				

Tabla 22: Concentración de saturación de candesartán cilexetilo a los distintos pH estudiados



Gráfica 2: Perfil de concentraciones a saturación en función del pH de candesartán cilexetilo a 37°C

1.2.2. Medios de disolución biopredictivos

En la tabla N° 23 se muestran las concentraciones experimentales de saturación de candesartán cilexetilo individuales y promedio en medios biopredictivos FaSSIF y FaSSGF a las 24 horas.

Medio	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
FaSSGF	0,0818	0,0822	0,0004	0,49	1,56
	0,0823				
	0,0826				
FaSSIF	0,0897	0,0894	0,0003	0,34	1,43
	0,0893				
	0,0891				

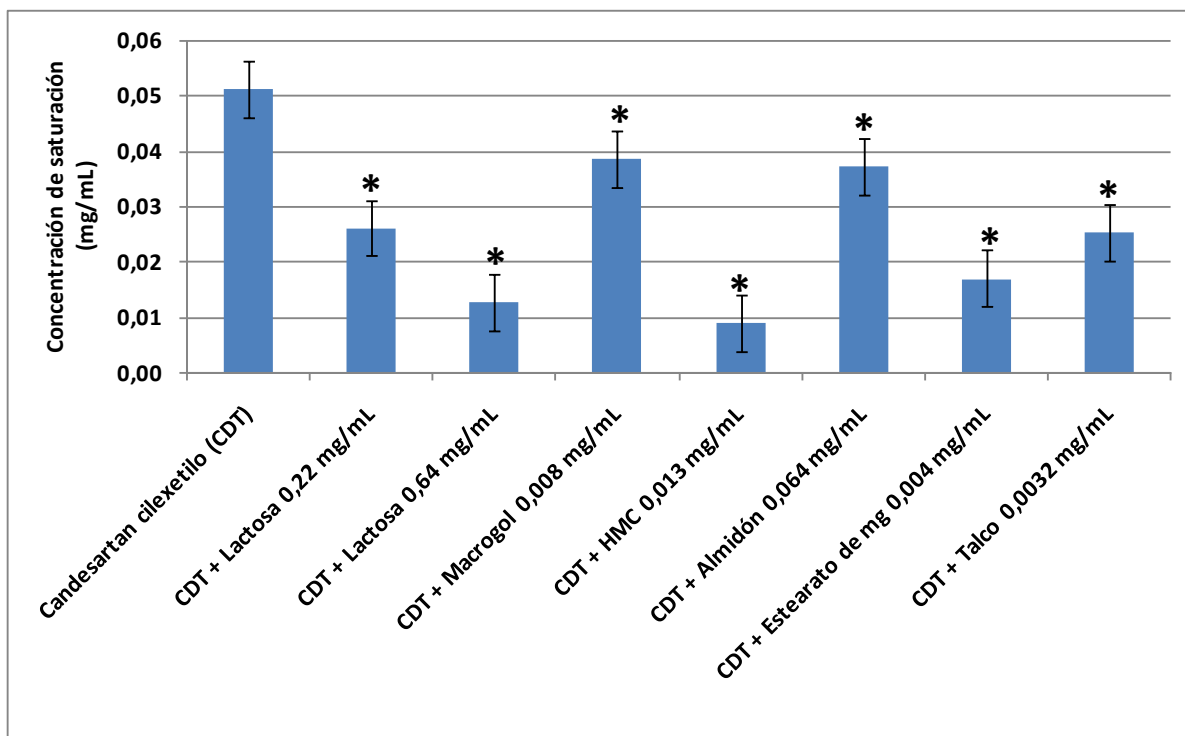
Tabla 23: Concentración de saturación de candesartán cilexetilo en medios biopredictivos

1.2.3. Excipientes

En la tabla N° 24 se muestran las concentraciones experimentales de saturación de candesartán cilexetilo individuales y promedio en presencia de cada excipiente a las 24 horas, como medio de disolución se utilizó agua. En la gráfica N° 3 se muestra la concentración de saturación de candesartán cilexetilo en agua y presencia de excipientes.

Excipiente	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
Candesartan cilexetilo	0,0517	0,0511	0,0006	1,09	2,50
	0,0506				
	0,0510				
Lactosa 0,22 mg/mL	0,0255	0,0262	0,0007	2,70	4,88
	0,0263				
	0,0269				
Lactosa 0,64 mg/mL	0,0124	0,0129	0,0006	5,00	9,95
	0,0136				
	0,0126				
Macrogol 0,008 mg/mL	0,0392	0,0387	0,0005	1,18	3,31
	0,0383				
	0,0386				
Hidroximetilcelulosa 0,013 mg/mL	0,0096	0,0092	0,0004	4,35	13,92
	0,0088				
	0,0092				
Almidón 0,064 mg/mL	0,0377	0,0373	0,0005	1,27	3,43
	0,0375				
	0,0368				
Estearato de Mg 0,004 mg/mL	0,0167	0,0171	0,0004	2,11	7,49
	0,0174				
	0,0172				
Talco 0,0032 mg/mL	0,0252	0,0253	0,0004	1,60	5,07
	0,0249				
	0,0257				

Tabla 24: Concentración de saturación de candesartán cilexetilo en presencia de excipientes



Gráfica 3: Concentración de saturación de candesartán cilexetilo en presencia de excipientes

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	0,441	0,862	NS
ANOVA		<0,0001	S

Tabla 25: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a la concentración de saturación de candesartán cilexetilo en presencia de excipientes de las formulaciones en estudio (Referencia, A y B)

Prueba de Comparación Múltiple de Scheffe	
Excipientes	Candesartán cilexetilo
Lactosa 0,22 mg/mL	S
Lactosa 0,64 mg/mL	S
Macrogol	S
Hidroxipropilcelulosa	S
Almidón	S
Estearato de Magnesio	S
Talco	S

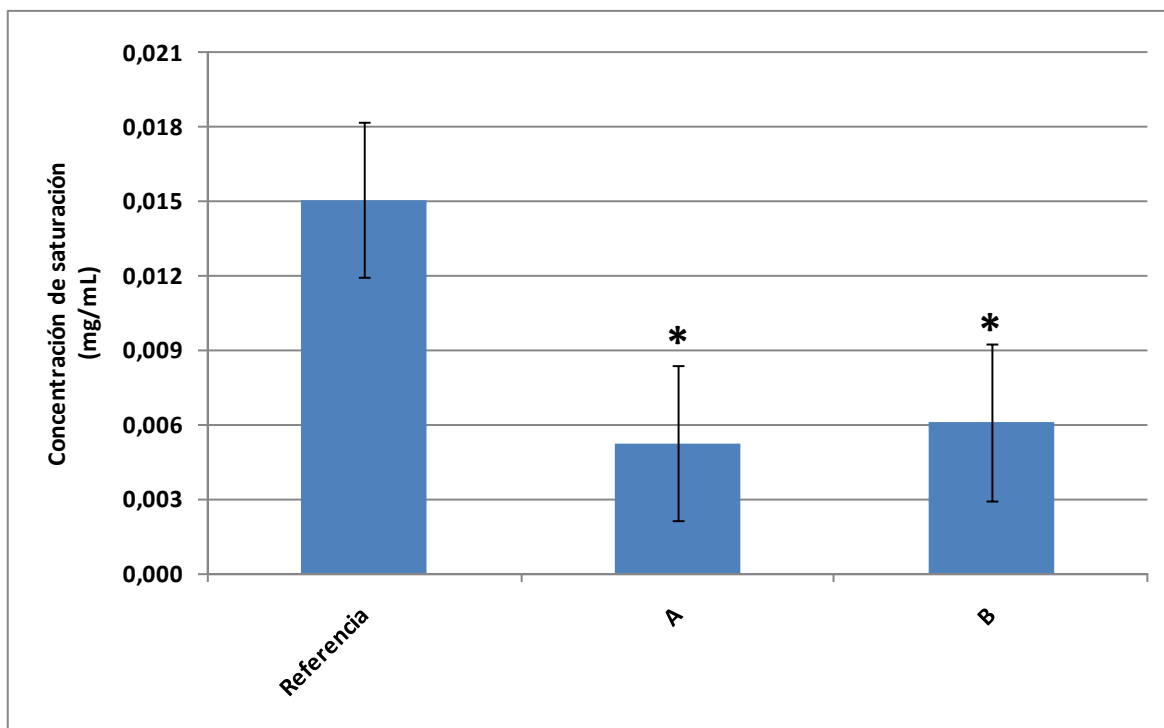
Tabla 26: Resultado de la comparación múltiple múltiple de Scheffe de la concentración de saturación de candesartán cilexetilo en presencia de excipientes de las formulaciones en estudio (Referencia, A y B)

1.2.4. Producto terminado

En la tabla N° 27 se muestran las concentraciones experimentales de saturación de candesartán cilexetilo individuales y promedio a partir del producto terminado de las formulaciones estudiadas de este fármaco en 24 horas, como medio de disolución se utilizó agua. En la gráfica N° 4 se muestra la concentración de saturación de las formulaciones en estudio candesartán cilexetilo.

Formulación	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
Referencia	0,0147	0,0151	0,0004	2,33	8,46
	0,0154				
	0,0151				
A	0,0050	0,0053	0,0003	5,80	24,08
	0,0056				
	0,0052				
B	0,0061	0,0061	0,0003	4,92	20,84
	0,0064				
	0,0058				

Tabla 27: Concentración de saturación de las formulaciones en estudio de candesartán cilexetilo



Gráfica 4: Concentración de saturación de las formulaciones en estudio de candesartán cilexetilo

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	0,054	0,948	NS
ANOVA		<0,0001	S

Tabla 28: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a la concentración de saturación de candesartán cilexetilo de las formulaciones en estudio (Referencia, A y B)

Prueba de Comparación Múltiple de Scheffe	
Formulación	Referencia
A	S
B	S

Tabla 29: Resultado de la comparación múltiple de Scheffe de la concentración de saturación de candesartán cilexetilo de las formulaciones en estudio (Referencia, A y B)

1.3. Ensayo de disgregación para las formulaciones de candesatán cilexetilo

En la tabla N° 30, se resumen los tiempos de disgregación (en minutos) en agua del producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo, según lo establecido en la EP.

Formulación	Tiempo de disgregación individual (min)						Promedio (min)	DE	CV %
	1	2	3	4	5	6			
Referencia	4,3	4,7	4,7	4,8	4,6	4,8	4,6	0,2	4,1
A	2,5	2,8	2,9	3,1	3,2	2,9	2,9	0,3	9,7
B	3,6	3,7	4,8	4,5	4,8	4,9	4,4	0,6	13,6

Tabla 30: Tiempo de disgregación de las formulaciones en estudio de candesartán cilexetilo

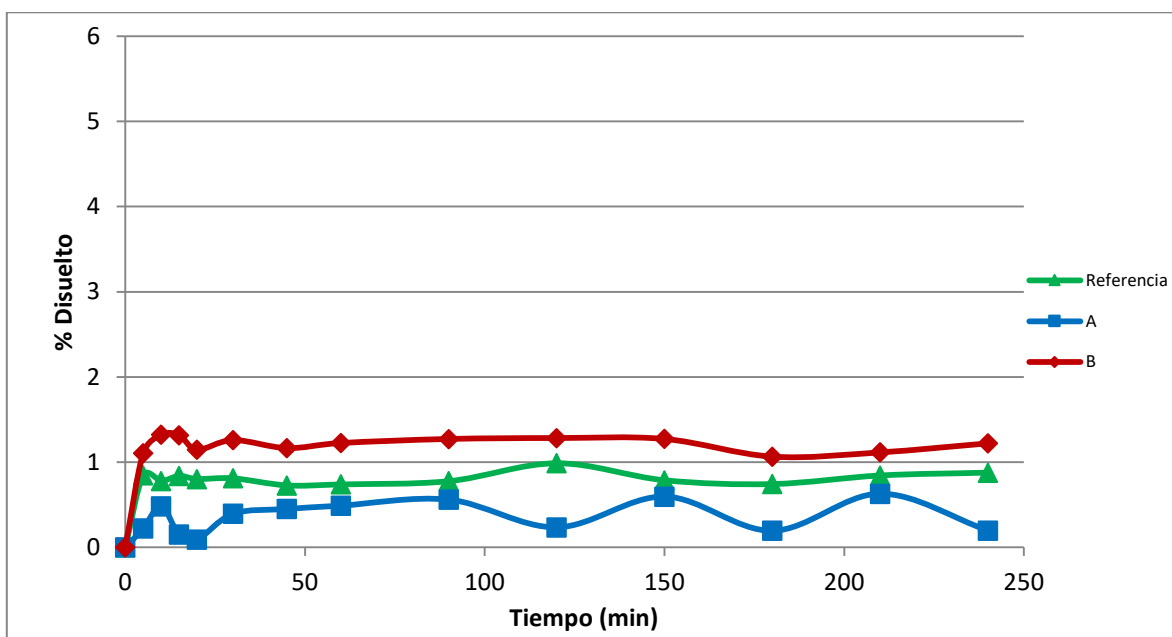
1.4. Perfiles de disolución de las formulaciones de candesartán cilexetilo

1.4.1. Aparato de disolución II, paletas

En las tablas N° 31, 32 y 33 se resumen los valores de medios de porcentaje disuelto de candesartán cilexetilo en función del tiempo, de producto de referencia y las formulaciones A y B en los medios recomendados por la guía de bioexenciones de la EMA. Las representaciones gráficas de estos perfiles se pueden observar en las gráficas N° 5, 6 y 7.

pH 1,2 (tampón cloruro 50 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	0,85 \pm 0,03	3,04	0,22 \pm 0,02	7,09	1,11 \pm 0,08	7,17
10	0,78 \pm 0,06	8,06	0,48 \pm 0,03	6,18	1,32 \pm 0,09	6,45
15	0,84 \pm 0,06	7,58	0,15 \pm 0,01	7,52	1,32 \pm 0,05	3,67
20	0,80 \pm 0,04	5,35	0,09 \pm 0,01	8,90	1,15 \pm 0,05	4,04
30	0,81 \pm 0,03	4,02	0,40 \pm 0,03	7,52	1,26 \pm 0,04	3,44
45	0,73 \pm 0,05	7,46	0,45 \pm 0,04	8,52	1,17 \pm 0,05	3,91
60	0,74 \pm 0,01	1,10	0,49 \pm 0,05	9,75	1,23 \pm 0,02	1,63
90	0,78 \pm 0,03	3,94	0,56 \pm 0,01	2,62	1,27 \pm 0,08	6,48
120	0,99 \pm 0,03	2,79	0,24 \pm 0,01	6,04	1,28 \pm 0,08	6,20
150	0,79 \pm 0,06	7,52	0,60 \pm 0,01	1,59	1,27 \pm 0,03	2,49
180	0,74 \pm 0,02	3,34	0,20 \pm 0,01	4,77	1,07 \pm 0,02	1,76
210	0,84 \pm 0,02	1,84	0,63 \pm 0,02	2,39	1,12 \pm 0,05	4,85
240	0,88 \pm 0,07	7,87	0,20 \pm 0,01	3,02	1,22 \pm 0,03	2,50

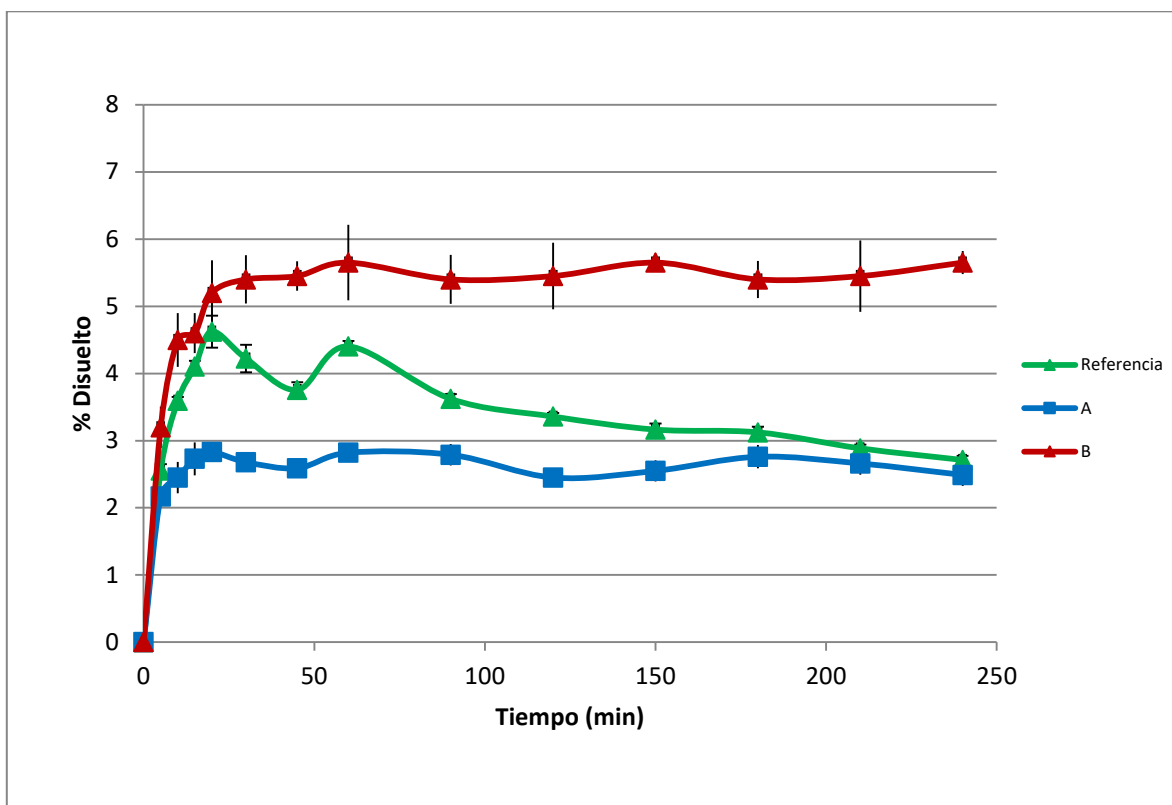
Tabla 31: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio tampón pH 1,2 de cloruro de sodio 50 mM empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 5: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en tampón pH 1,2 de cloruro de sodio 50 mM (n=6) (Cloruro)

pH 4,5 (tampón acetato 36,5 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	2,55 \pm 0,10	3,90	2,17 \pm 0,10	478	3,20 \pm 0,31	9,59
10	3,59 \pm 0,06	1,59	2,45 \pm 0,23	9,45	4,50 \pm 0,40	8,89
15	4,10 \pm 0,09	2,13	2,73 \pm 0,25	8,98	4,60 \pm 0,30	6,49
20	4,62 \pm 0,24	5,14	2,83 \pm 0,11	3,85	5,20 \pm 0,48	9,29
30	4,22 \pm 0,20	4,80	2,68 \pm 0,09	3,19	5,40 \pm 0,36	6,67
45	3,76 \pm 0,11	3,03	2,59 \pm 0,06	2,24	5,45 \pm 0,22	4,00
60	4,40 \pm 0,08	1,85	2,82 \pm 0,10	3,38	5,65 \pm 0,56	9,97
90	3,62 \pm 0,07	2,02	2,79 \pm 0,16	5,76	5,40 \pm 0,36	6,74
120	3,36 \pm 0,06	1,67	2,45 \pm 0,07	2,92	5,45 \pm 0,50	9,10
150	3,16 \pm 0,09	2,88	2,55 \pm 0,16	6,22	5,65 \pm 0,11	1,91
180	3,12 \pm 0,09	2,75	2,76 \pm 0,17	6,31	5,40 \pm 0,28	5,13
210	2,89 \pm 0,06	1,93	2,66 \pm 0,17	6,36	5,45 \pm 0,53	9,76
240	2,71 \pm 0,06	2,29	2,49 \pm 0,16	6,58	5,65 \pm 0,17	3,04

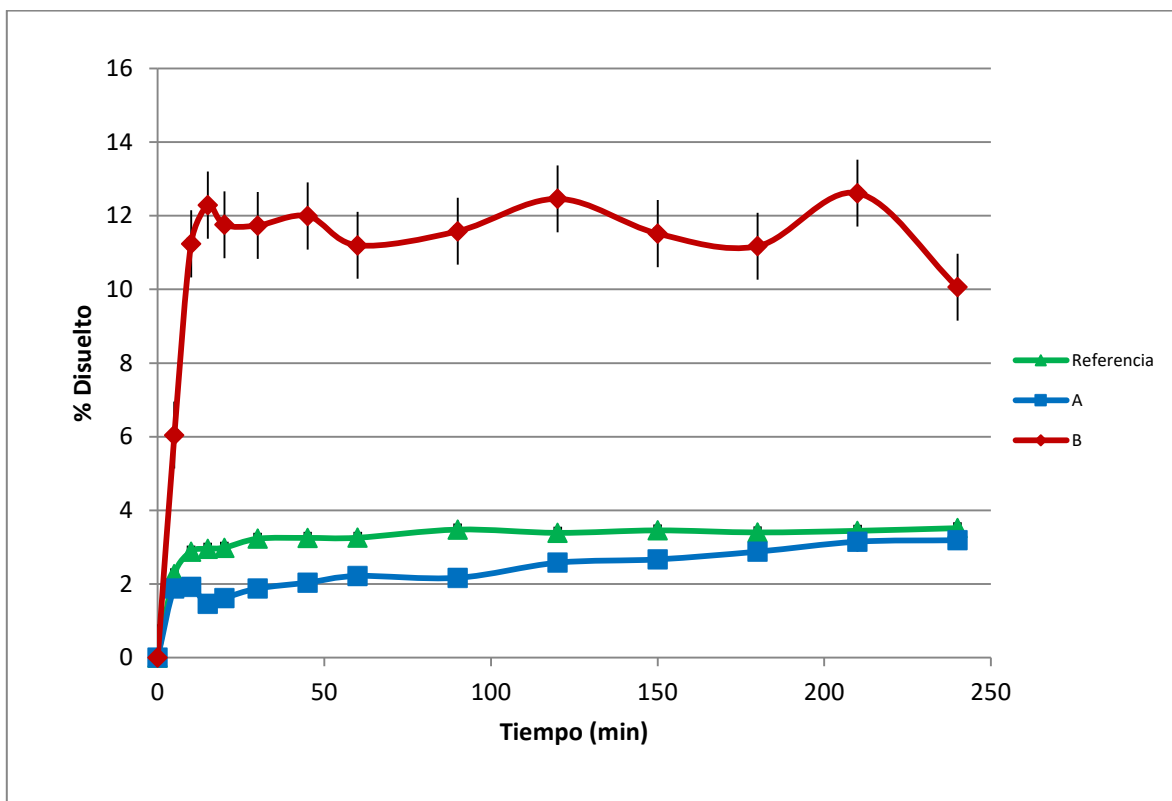
Tabla 32: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio tampón pH 4,5 de acetato de sodio 36,5 mM empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 6: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en tampón pH 4,5 de acetato de sodio 36,5 mM (n=6)

pH 6,8 (tampón fosfato 50 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	2,27 \pm 0,13	5,59	1,88 \pm 0,17	8,95	6,05 \pm 0,49	8,09
10	2,88 \pm 0,15	5,10	1,92 \pm 0,12	6,46	11,24 \pm 0,74	6,57
15	2,96 \pm 0,05	1,81	1,46 \pm 0,07	4,65	12,29 \pm 0,62	5,01
20	2,99 \pm 0,06	2,06	1,62 \pm 0,05	3,21	11,76 \pm 0,42	3,59
30	3,23 \pm 0,05	1,48	1,88 \pm 0,06	3,40	11,73 \pm 1,02	8,65
45	3,25 \pm 0,07	2,03	2,04 \pm 0,08	3,99	11,99 \pm 0,59	4,91
60	3,26 \pm 0,07	2,10	2,22 \pm 0,08	3,80	11,20 \pm 0,64	5,69
90	3,48 \pm 0,04	1,04	2,17 \pm 0,06	2,55	11,58 \pm 0,87	7,55
120	3,39 \pm 0,08	2,33	2,58 \pm 0,22	8,62	12,46 \pm 1,07	8,60
150	3,46 \pm 0,09	2,54	2,67 \pm 0,15	5,77	11,52 \pm 1,11	9,62
180	3,40 \pm 0,04	1,27	2,88 \pm 0,17	6,06	11,17 \pm 1,08	9,63
210	3,45 \pm 0,05	1,44	3,15 \pm 0,27	8,52	12,61 \pm 1,15	9,13
240	3,52 \pm 0,06	1,60	3,19 \pm 0,26	8,16	10,06 \pm 0,99	9,85

Tabla 33: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 50 mM empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)

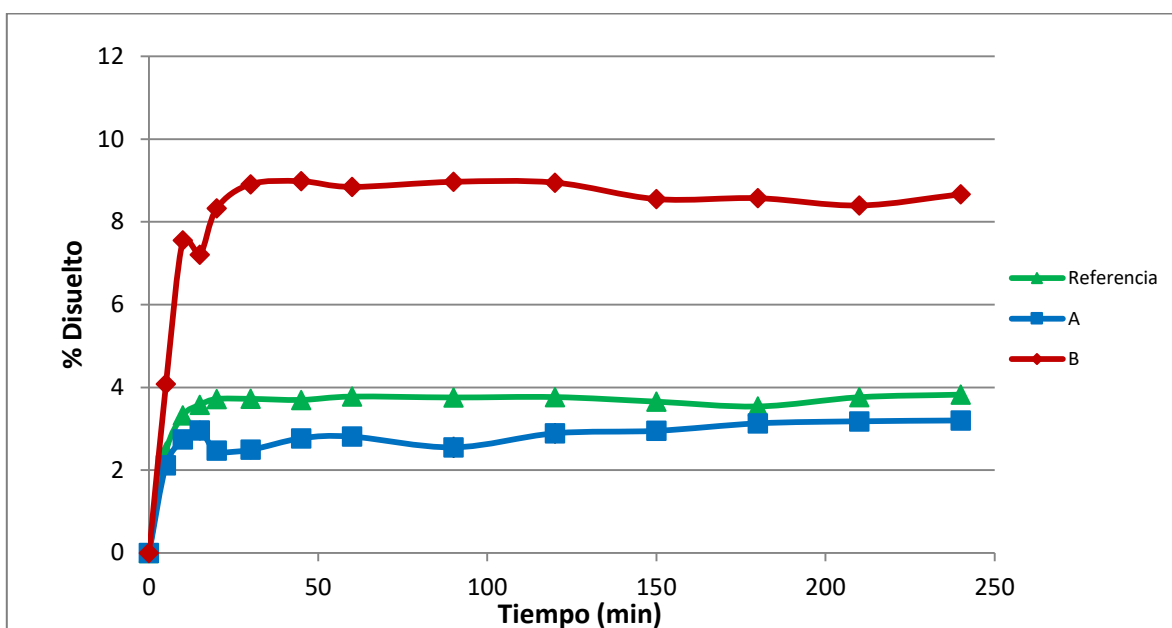


Gráfica 7: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 50 mM (n=6)

En la tabla N° 34, se resumen los valores de medios de porcentaje disuelto de candesartán cilexetilo en función del tiempo de producto de referencia y las formulaciones A y B en pH 6,8 de menor concentración iónica que la establecida en la EP. La representación gráfica de este perfil se pueden observar en la gráfica N° 8.

pH 6,8 (tampón fosfato 10 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	2,45 \pm 0,12	4,82	2,12 \pm 0,21	9,71	4,08 \pm 0,36	8,83
10	3,32 \pm 0,23	6,77	2,75 \pm 0,10	3,60	7,56 \pm 0,54	7,11
15	3,58 \pm 0,03	0,74	2,96 \pm 0,24	8,02	7,21 \pm 0,66	9,17
20	3,72 \pm 0,13	3,60	2,47 \pm 0,21	8,65	8,33 \pm 0,78	9,41
30	3,72 \pm 0,03	0,94	2,49 \pm 0,23	9,20	8,91 \pm 0,24	2,72
45	3,70 \pm 0,04	1,03	2,77 \pm 0,13	4,56	8,98 \pm 0,48	5,31
60	3,78 \pm 0,08	2,06	2,81 \pm 0,12	4,44	8,85 \pm 0,53	5,99
90	3,76 \pm 0,04	1,06	2,55 \pm 0,25	9,88	8,97 \pm 0,71	7,91
120	3,77 \pm 0,05	1,40	2,89 \pm 0,25	8,67	8,95 \pm 0,44	4,92
150	3,65 \pm 0,15	4,17	2,95 \pm 0,04	1,45	8,55 \pm 0,23	2,71
180	3,54 \pm 0,04	1,17	3,13 \pm 0,08	2,64	8,57 \pm 0,83	9,68
210	3,76 \pm 0,06	1,47	3,18 \pm 0,09	2,93	8,40 \pm 0,09	1,07
240	3,82 \pm 0,04	1,13	3,20 \pm 0,01	0,33	8,67 \pm 0,77	8,87

Tabla 34: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 10 mM empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)

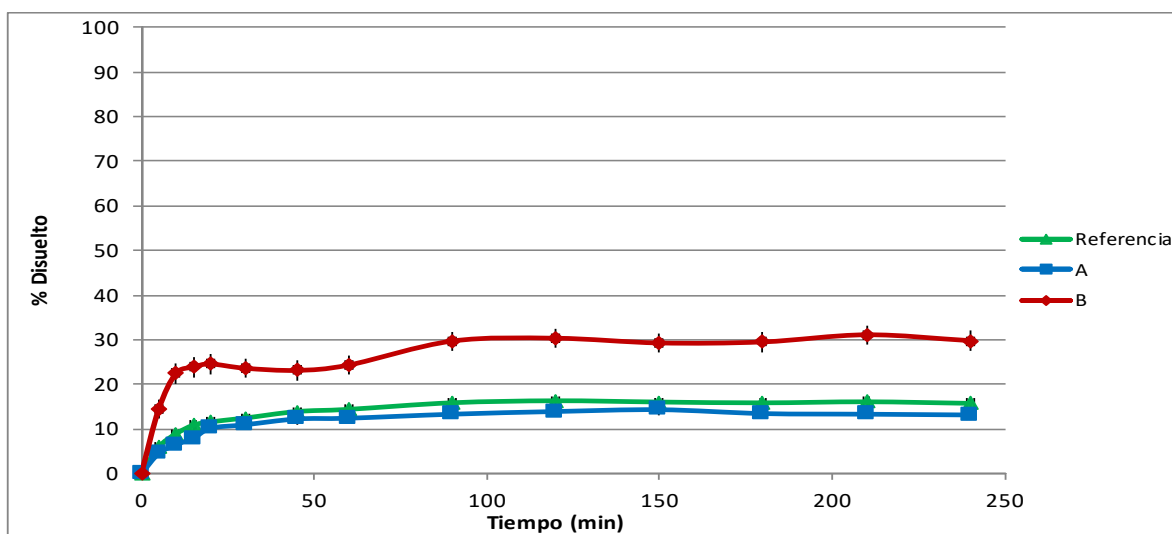


Gráfica 8: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 10 mM (n=6)

En las tablas N° 35, 36, 37, 38, 39 y 40 se presentan los valores medios de porcentaje disuelto de candesartán cilexetilo en función del tiempo del producto de referencia y las formulaciones A y B en medios a pH 6,5 combinados con LSS 0,1 y 1%.; Tween 20 con 0,30; 0,20; 0,15; 0,10%. Las gráficas N° 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se muestran el porcentaje disuelto en función del tiempo correspondiente a los medios antes mencionados

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con LSS 0,1%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	5,88 \pm 0,25	4,22	4,49 \pm 0,36	7,97	14,38 \pm 0,92	6,41
10	8,87 \pm 0,41	4,62	6,42 \pm 0,54	8,47	22,41 \pm 1,96	8,76
15	10,80 \pm 0,99	9,16	7,87 \pm 0,61	7,71	23,84 \pm 1,84	7,70
20	11,56 \pm 0,74	6,42	10,12 \pm 0,72	7,07	24,54 \pm 1,80	7,32
30	12,42 \pm 0,17	1,36	10,91 \pm 1,01	9,27	23,59 \pm 1,81	7,68
45	13,88 \pm 0,92	6,60	12,21 \pm 0,73	5,98	23,11 \pm 1,28	5,53
60	14,37 \pm 0,99	6,92	12,38 \pm 0,56	4,52	24,30 \pm 1,93	7,95
90	15,85 \pm 0,57	3,61	13,28 \pm 0,91	6,85	29,68 \pm 1,17	3,95
120	16,29 \pm 0,87	5,36	13,88 \pm 0,86	6,18	30,32 \pm 1,10	3,64
150	16,01 \pm 0,24	1,48	14,29 \pm 1,26	8,79	29,26 \pm 1,35	4,60
180	15,83 \pm 0,40	2,54	13,42 \pm 0,62	4,63	29,49 \pm 1,01	3,44
210	16,06 \pm 0,71	4,43	13,28 \pm 0,79	5,97	31,09 \pm 1,11	3,57
240	15,72 \pm 0,81	5,17	13,11 \pm 0,85	6,51	29,78 \pm 1,86	6,23

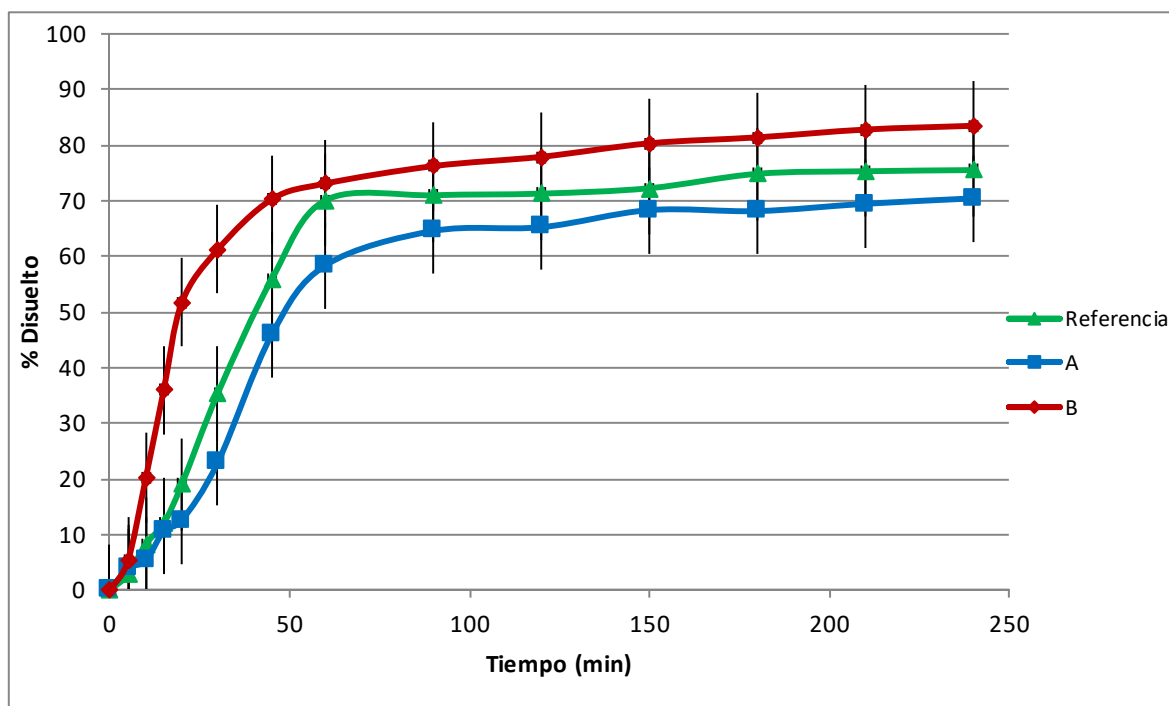
Tabla 35: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 0,1% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 9: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 0,1% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con LSS 1%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	2,80 \pm 0,17	5,95	1,89 \pm 0,31	7,97	5,20 \pm 0,44	8,39
10	8,29 \pm 0,11	1,35	5,34 \pm 0,47	8,83	20,18 \pm 0,82	4,08
15	12,01 \pm 0,22	1,81	10,64 \pm 0,55	5,17	36,02 \pm 2,41	6,70
20	18,99 \pm 0,48	2,52	12,56 \pm 1,25	9,95	51,64 \pm 2,52	4,87
30	35,35 \pm 0,39	1,09	22,93 \pm 1,49	6,48	61,21 \pm 2,78	4,54
45	55,85 \pm 2,61	4,67	45,92 \pm 1,54	3,35	70,22 \pm 3,33	4,74
60	70,07 \pm 1,17	1,67	58,39 \pm 1,67	2,86	73,07 \pm 2,38	3,25
90	70,96 \pm 1,33	1,87	64,55 \pm 2,41	3,74	76,20 \pm 2,40	3,16
120	71,25 \pm 1,08	1,52	65,22 \pm 1,11	1,71	77,87 \pm 3,12	4,01
150	72,22 \pm 1,13	1,57	68,29 \pm 2,66	3,90	80,29 \pm 4,36	5,44
180	74,81 \pm 2,17	2,90	68,11 \pm 0,95	1,40	81,36 \pm 3,44	4,23
210	75,27 \pm 2,41	3,20	69,42 \pm 0,70	1,01	82,76 \pm 4,20	5,08
240	75,48 \pm 1,04	1,37	70,40 \pm 0,73	1,04	83,44 \pm 2,70	3,24

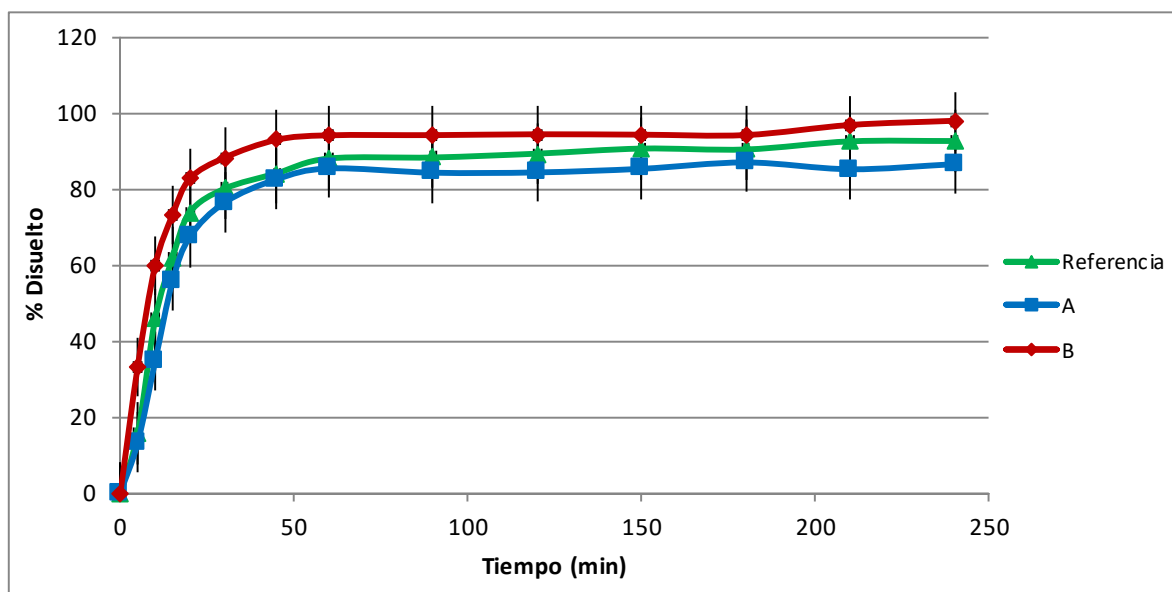
Tabla 36: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 1% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 10: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 1% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,30%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	15,67 \pm 1,07	6,84	13,22 \pm 1,07	8,08	33,29 \pm 2,55	7,42
10	45,69 \pm 2,55	5,59	34,55 \pm 2,08	6,01	59,72 \pm 3,55	3,17
15	61,78 \pm 1,28	2,07	55,63 \pm 3,76	6,75	73,09 \pm 3,14	5,48
20	73,81 \pm 1,09	1,47	67,34 \pm 1,24	1,84	82,65 \pm 1,82	6,20
30	80,01 \pm 1,45	1,81	76,39 \pm 4,49	5,88	88,18 \pm 1,88	4,83
45	84,07 \pm 1,18	1,40	82,49 \pm 4,28	5,18	92,87 \pm 3,82	5,23
60	87,95 \pm 2,18	2,48	85,34 \pm 5,29	6,20	94,05 \pm 3,26	6,02
90	88,22 \pm 2,05	2,32	84,21 \pm 4,56	5,41	94,10 \pm 4,64	5,00
120	89,23 \pm 1,12	1,26	84,29 \pm 2,23	2,64	94,33 \pm 4,47	2,67
150	90,56 \pm 2,05	2,26	85,24 \pm 3,16	3,71	94,22 \pm 3,51	1,15
180	90,33 \pm 1,09	1,20	86,91 \pm 5,26	6,05	94,12 \pm 2,79	3,78
210	92,46 \pm 1,45	1,57	85,12 \pm 2,80	3,29	96,77 \pm 2,96	2,38
240	92,55 \pm 1,18	1,27	86,46 \pm 3,23	3,74	97,88 \pm 2,18	2,08

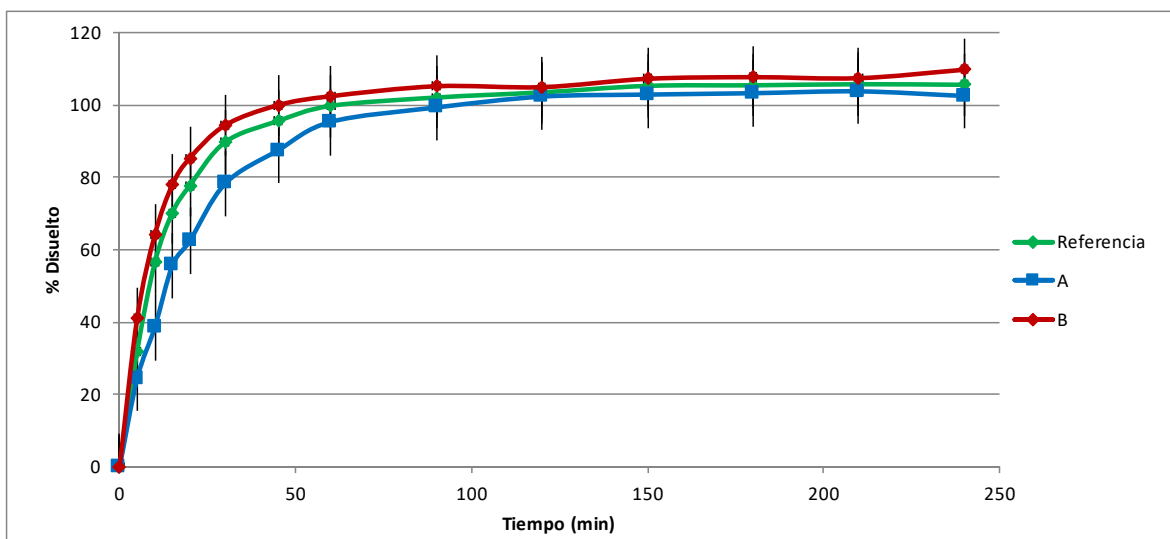
Tabla 37: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,30% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 11: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,30% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,20%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	32,08 \pm 0,83	4,08	24,46 \pm 1,23	4,26	41,10 \pm 1,91	7,42
10	56,45 \pm 0,57	5,39	38,59 \pm 1,19	5,44	64,09 \pm 1,82	3,17
15	70,28 \pm 0,55	4,44	55,66 \pm 1,40	5,62	77,98 \pm 1,85	5,48
20	77,83 \pm 1,50	2,62	62,55 \pm 1,43	5,02	85,39 \pm 2,90	6,20
30	89,76 \pm 0,49	4,57	78,29 \pm 1,15	4,08	94,42 \pm 2,25	4,83
45	95,58 \pm 0,54	4,34	87,48 \pm 2,41	1,21	99,95 \pm 2,07	5,23
60	99,76 \pm 0,67	3,13	95,34 \pm 3,10	2,22	102,43 \pm 2,94	6,02
90	102,07 \pm 0,41	3,07	99,32 \pm 2,09	4,15	105,18 \pm 1,21	5,00
120	103,50 \pm 1,11	1,06	102,32 \pm 3,11	3,94	104,93 \pm 3,13	2,67
150	105,28 \pm 0,66	2,06	102,88 \pm 4,11	1,96	107,24 \pm 3,31	1,15
180	105,44 \pm 0,95	2,98	103,26 \pm 3,13	1,08	107,69 \pm 2,83	3,78
210	105,74 \pm 0,70	2,13	103,77 \pm 1,17	3,05	107,41 \pm 1,81	2,38
240	105,59 \pm 0,73	1,00	102,49 \pm 2,07	1,07	109,74 \pm 1,69	2,08

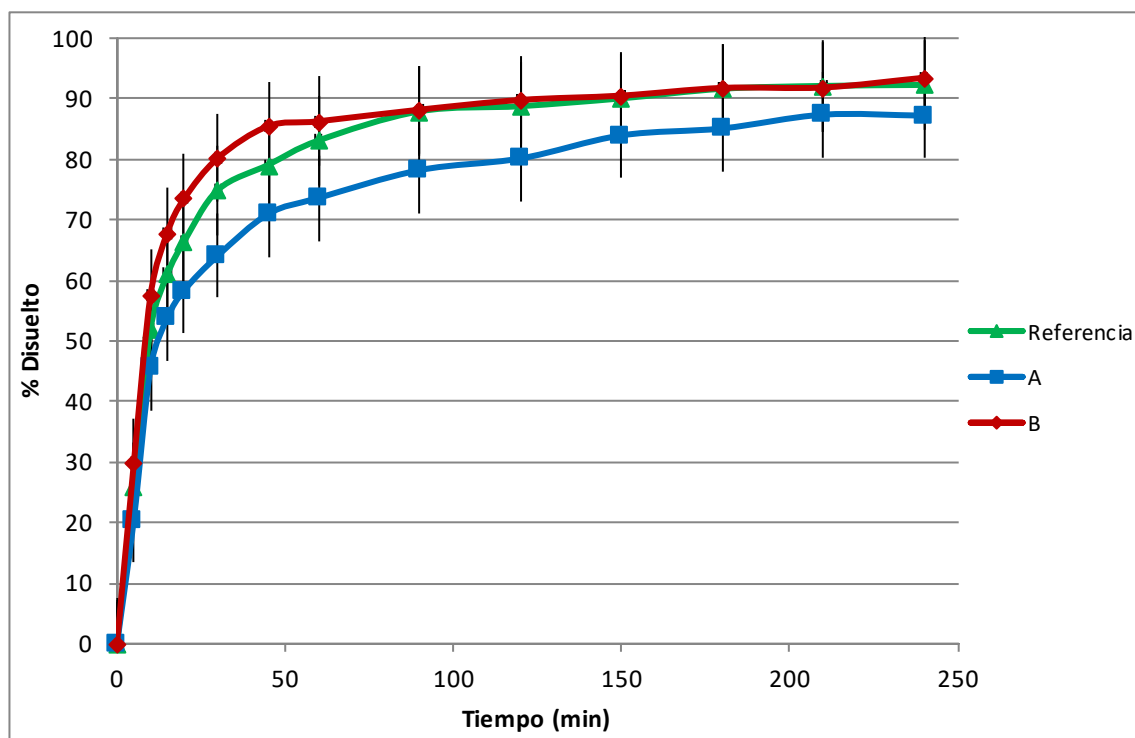
Tabla 38: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,20% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 12: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,20% (n=6).

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,15%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	25,90 \pm 0,83	3,19	20,54 \pm 1,23	5,97	29,84 \pm 1,91	6,39
10	52,11 \pm 0,57	1,08	45,66 \pm 1,19	2,62	57,71 \pm 1,82	3,16
15	61,04 \pm 0,55	0,90	53,84 \pm 1,40	2,60	67,93 \pm 1,85	2,72
20	66,48 \pm 1,50	2,26	58,39 \pm 1,43	2,46	73,54 \pm 2,90	3,94
30	74,96 \pm 0,49	0,65	64,11 \pm 1,15	1,80	80,22 \pm 2,25	2,81
45	79,11 \pm 0,54	0,68	70,99 \pm 2,41	3,40	85,50 \pm 2,07	2,42
60	83,14 \pm 0,67	0,81	73,64 \pm 3,10	4,21	86,29 \pm 2,94	3,41
90	87,94 \pm 0,41	0,47	78,22 \pm 2,09	2,67	88,21 \pm 1,21	1,37
120	88,78 \pm 1,11	1,25	80,15 \pm 3,11	3,88	89,81 \pm 3,13	3,48
150	90,07 \pm 0,66	0,74	83,96 \pm 4,11	4,89	90,53 \pm 3,31	3,65
180	91,66 \pm 0,95	1,04	85,11 \pm 3,13	3,68	91,81 \pm 2,83	3,08
210	92,13 \pm 0,70	0,76	87,38 \pm 1,17	1,34	91,87 \pm 1,81	1,97
240	92,29 \pm 0,73	0,79	87,22 \pm 2,07	2,37	93,49 \pm 1,69	1,81

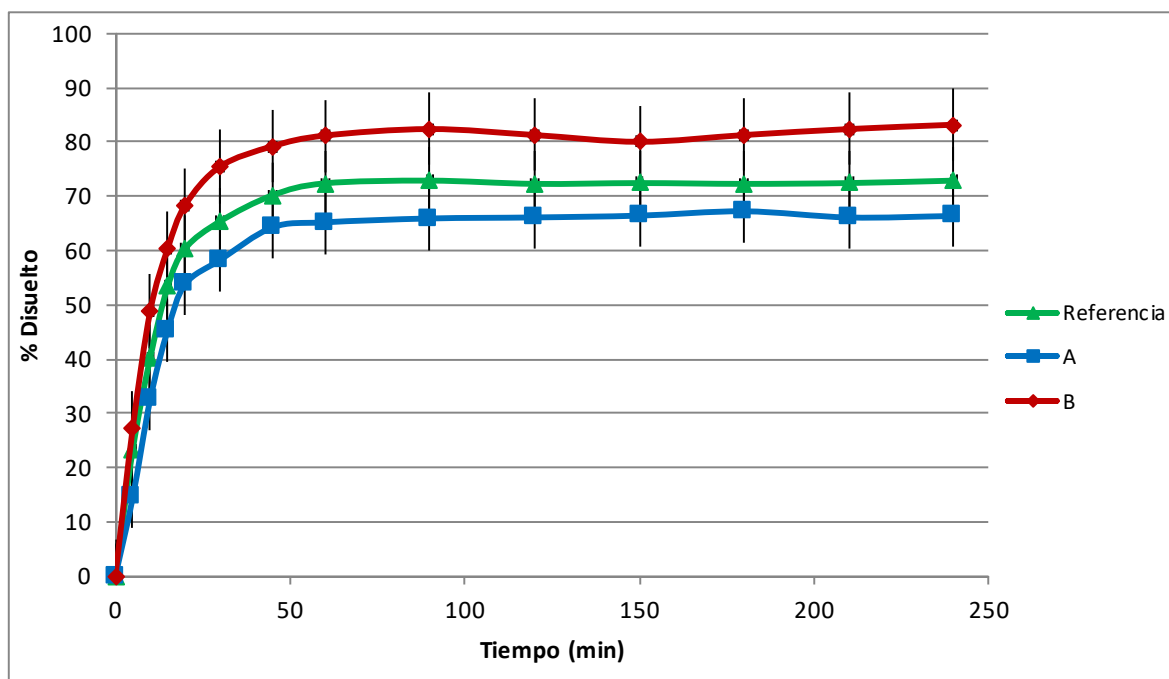
Tabla 39: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,15% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 13: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,15% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,10%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	23,40 \pm 1,23	5,24	14,59 \pm 1,33	9,09	27,40 \pm 2,31	8,43
10	40,30 \pm 1,07	2,65	32,66 \pm 1,34	4,10	48,90 \pm 4,12	8,43
15	53,40 \pm 1,26	2,35	45,38 \pm 3,64	8,01	60,40 \pm 5,49	9,09
20	60,40 \pm 2,13	3,52	53,82 \pm 4,30	7,99	68,40 \pm 5,07	7,41
30	65,40 \pm 2,54	3,89	58,29 \pm 3,91	6,70	75,50 \pm 4,95	6,55
45	70,20 \pm 1,23	1,75	64,28 \pm 3,32	5,16	79,23 \pm 5,08	6,41
60	72,40 \pm 1,19	1,65	65,22 \pm 3,39	5,19	81,20 \pm 4,62	5,69
90	72,90 \pm 3,40	4,67	65,93 \pm 1,28	1,95	82,40 \pm 4,69	5,70
120	72,30 \pm 2,43	3,37	66,12 \pm 1,49	2,25	81,30 \pm 5,32	6,54
150	72,45 \pm 3,15	4,35	66,45 \pm 0,61	0,92	80,05 \pm 4,68	5,85
180	72,30 \pm 1,36	1,88	67,25 \pm 0,33	0,49	81,30 \pm 4,52	5,57
210	72,45 \pm 1,09	1,51	66,11 \pm 1,64	2,48	82,40 \pm 5,32	6,46
240	72,90 \pm 1,34	1,84	66,39 \pm 1,53	2,31	83,20 \pm 3,78	4,54

Tabla 40: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,10% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)

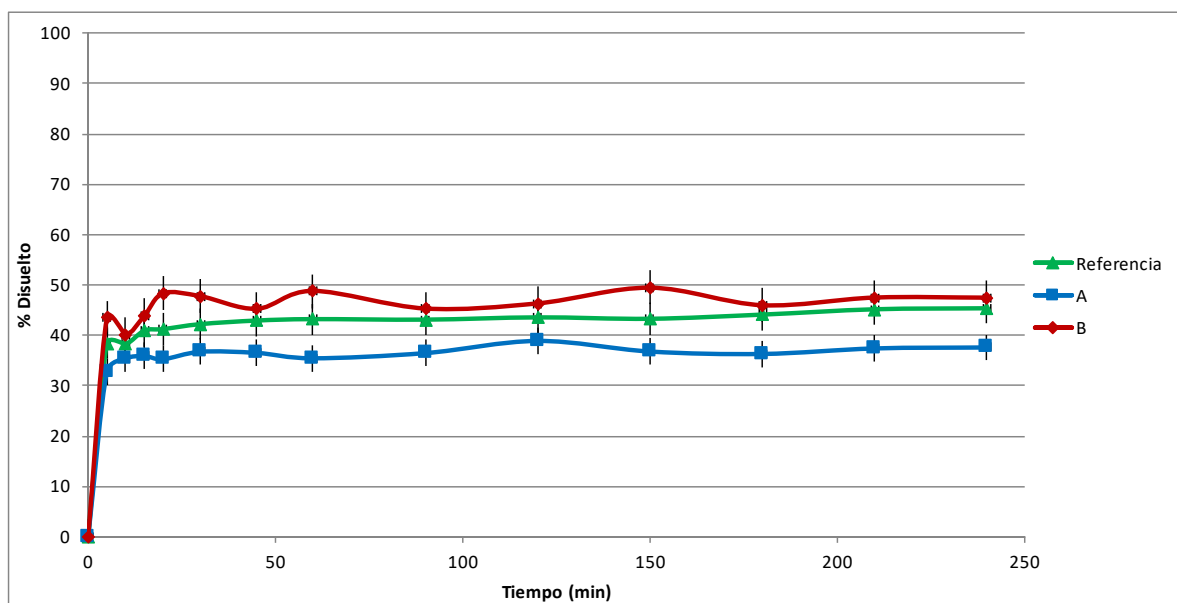


Gráfica 14: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,10% (n=6)

En la tabla N° 41, se presenta los valores medios de porcentaje disuelto de Candesartán cilexetilo en función del tiempo de producto de referencia y las formulaciones A y B en medio FaSSIF. La gráfica N° 15 se muestra el porcentaje disuelto en función del tiempo correspondiente al medio antes mencionado.

FaSSIF. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	38,34 \pm 0,31	0,81	32,76 \pm 1,50	4,57	43,44 \pm 3,81	8,77
10	38,22 \pm 0,47	1,24	35,39 \pm 1,32	3,74	40,10 \pm 2,34	5,83
15	40,93 \pm 0,49	1,20	35,88 \pm 0,59	1,64	43,88 \pm 3,18	7,25
20	41,23 \pm 0,67	1,62	35,25 \pm 1,12	3,17	48,34 \pm 3,52	7,29
30	42,22 \pm 0,72	1,71	36,73 \pm 1,08	2,95	47,77 \pm 4,77	9,99
45	42,93 \pm 0,82	1,92	36,50 \pm 0,91	2,49	45,26 \pm 2,46	5,43
60	43,21 \pm 0,45	1,04	35,43 \pm 1,04	2,95	48,82 \pm 4,12	8,44
90	43,11 \pm 0,21	0,48	36,46 \pm 1,33	3,65	45,32 \pm 1,06	2,35
120	43,56 \pm 0,56	1,28	38,88 \pm 0,55	1,43	46,34 \pm 2,82	6,08
150	43,28 \pm 0,20	0,46	36,77 \pm 0,44	1,19	49,45 \pm 2,89	5,84
180	44,11 \pm 0,37	0,83	36,29 \pm 0,92	2,53	45,98 \pm 1,88	4,10
210	45,17 \pm 0,44	0,98	37,39 \pm 0,42	1,12	47,50 \pm 3,60	7,58
240	45,37 \pm 0,26	0,58	37,58 \pm 1,30	3,46	47,48 \pm 2,23	4,69

Tabla 41: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio FaSSIF empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 15: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en medio FaSSIF (n=6)

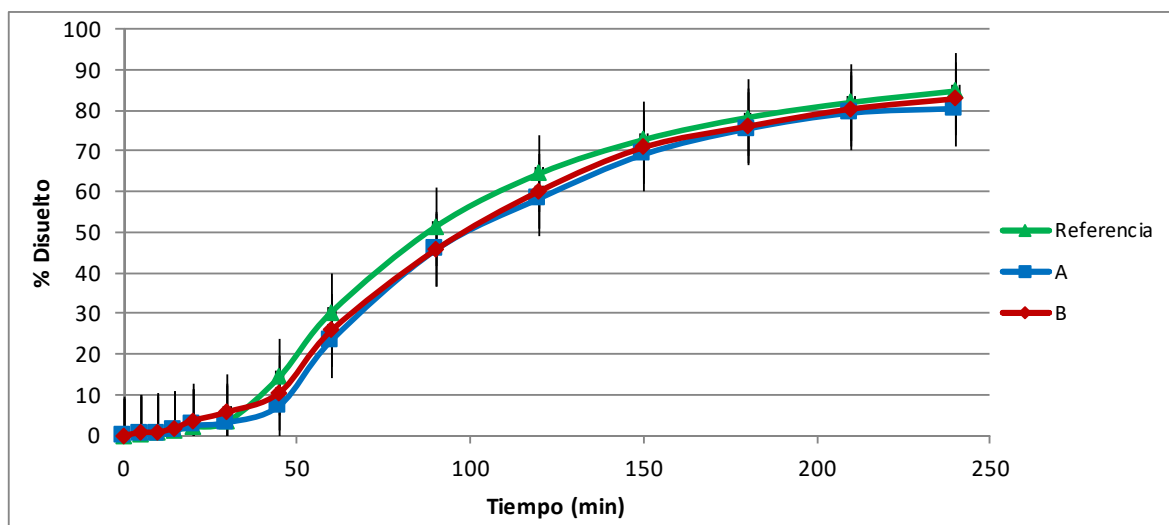
1.4.2. **Aparato de disolución IV, celda de flujo**

En las tablas N° 42 y N° 43 se presentan los valores medios de porcentaje disuelto de candesartán cilexetilo en función del tiempo de producto de referencia y las formulaciones A y B en los medios de disolución para bioexención (pH 1,2+pH 4,5+pH 6,8) todos con Tween 20 0,20%. El cambio de pH 1,2 a pH 4,5 se realizó en el minuto 15 del ensayo y el cambio de pH 4,5 a pH 6,8 se realizó en el minuto 30 del ensayo. En los medios de disolución FaSSGF+FaSSIF el cambio de medio se realizó en el minuto 15 del ensayo.

En las gráficas N° 16 y 17 se muestra el porcentaje disuelto en función del tiempo correspondiente al medio antes mencionado.

pH 1,2 50 mM + pH 4,5 36.5 mM + pH 6,8 50 mM todos con Tween 20 0,20 %.						
Aparato IV. 8 mL/min						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	0,47 \pm 0,02	3,67	0,45 \pm 0,04	8,04	0,77 \pm 0,04	5,36
10	0,77 \pm 0,02	3,06	0,54 \pm 0,03	6,27	0,87 \pm 0,03	3,78
15	1,45 \pm 0,03	1,74	1,27 \pm 0,02	1,41	1,94 \pm 0,04	1,81
20	2,11 \pm 0,04	2,14	2,47 \pm 0,05	2,12	3,70 \pm 0,08	2,25
30	3,47 \pm 0,07	2,05	3,20 \pm 0,08	2,41	5,83 \pm 0,06	1,04
45	14,51 \pm 0,08	0,57	7,43 \pm 0,10	1,35	10,60 \pm 0,59	5,58
60	30,42 \pm 0,09	0,29	23,47 \pm 1,12	4,77	25,91 \pm 0,14	0,52
90	51,38 \pm 0,08	0,16	45,65 \pm 1,06	2,33	45,72 \pm 0,80	1,76
120	64,47 \pm 0,03	0,05	58,37 \pm 0,82	1,40	60,17 \pm 0,80	1,33
150	72,79 \pm 0,02	0,02	69,17 \pm 0,89	1,28	70,91 \pm 3,23	4,55
180	78,23 \pm 0,10	0,13	75,47 \pm 0,88	1,17	76,07 \pm 4,94	6,49
210	81,97 \pm 0,76	0,93	79,37 \pm 0,60	0,76	80,36 \pm 3,20	3,98
240	84,76 \pm 0,60	0,71	80,45 \pm 2,77	2,77	82,87 \pm 3,00	3,62

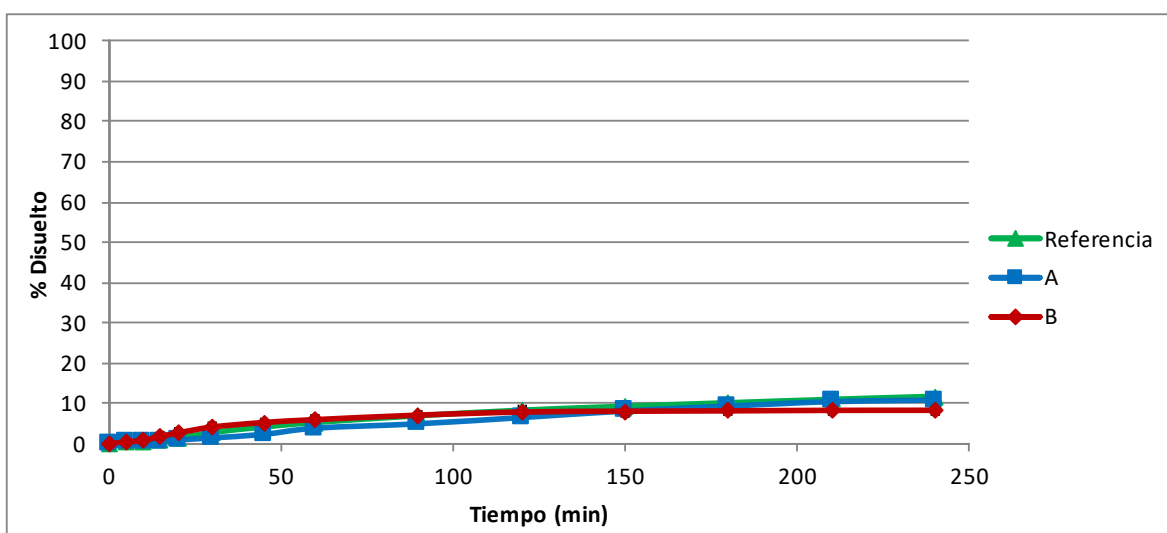
Tabla 42: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en medio pH 1,2 50 mM + pH 4,5 36,5 mM + pH 6,8 50 mM todos con Tween 20 0,20 % empleando aparato IV a 8 mL/min (n=6)



Gráfica 16: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en medio pH 1,2 50 mM + pH 4,5 36.5 mM + pH 6,8 50 mM todos con Tween 20 0,20 % (n=6)

FaSSGF+FaSSIF. Aparato IV. 8 mL/min						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		A		B	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	0,36 \pm 0,01	3,59	0,25 \pm 0,02	9,48	0,43 \pm 0,04	9,66
10	0,47 \pm 0,03	5,51	0,34 \pm 0,03	8,08	0,90 \pm 0,05	5,83
15	0,93 \pm 0,03	3,71	0,54 \pm 0,02	4,01	1,84 \pm 0,04	2,39
20	1,43 \pm 0,05	3,42	0,95 \pm 0,04	4,44	2,69 \pm 0,15	5,57
30	2,81 \pm 0,12	4,20	1,48 \pm 0,02	1,06	4,17 \pm 0,08	2,01
45	4,19 \pm 0,06	1,42	2,35 \pm 0,16	6,77	5,29 \pm 0,17	3,21
60	5,30 \pm 0,09	1,78	3,88 \pm 0,16	4,21	6,00 \pm 0,08	1,31
90	6,98 \pm 0,37	5,24	4,97 \pm 0,19	3,77	7,12 \pm 0,14	1,99
120	8,35 \pm 0,54	6,46	6,52 \pm 0,07	1,10	7,89 \pm 0,63	7,93
150	9,32 \pm 0,36	3,86	8,15 \pm 0,17	2,13	8,09 \pm 0,43	5,37
180	10,19 \pm 0,52	5,11	9,36 \pm 0,75	8,07	8,18 \pm 0,35	4,23
210	11,03 \pm 0,47	4,27	10,47 \pm 0,35	3,35	8,31 \pm 0,31	3,78
240	11,79 \pm 0,48	4,11	10,84 \pm 0,28	2,55	8,32 \pm 0,10	1,18

Tabla 43: Porcentajes disueltos de candesartán cilexetilo en función del tiempo en FaSSGF+FaSSIF, empleando aparato IV a 8 mL/min (n=6)



Gráfica 17: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo en medio FaSSGF+FaSSIF (n=6)

1.5. Comparación de los perfiles de disolución con el factor de similitud f_2 para las formulaciones de candesartán

1.5.1. Factor de similitud f_2 . Aparato II. 50 r.p.m.

En la tabla N° 44 se presentan los factores de similitud f_2 entre el producto referencia de candesartán cilexetilo y los productos en estudio del mismo fármaco A y B en los medios estudiados en el aparato II a 50 r.p.m.

Medios	A	B
pH 1,2 50 mM	97,6	98,3
pH 4,5 36,5 mM	91,7	84,4
pH 6,8 50 mM	92,5	54,3
pH 6,8 10 mM	94,1	66,0
LSS 0,1%	80,8	44,5
LSS 1%	57,5	41,1
Tween 20 0,30%	61,7	45,1
Tween 20 0,20%	42,9	54,7
Tween 20 0,15%	53,8	61,0
Tween 20 0,10%	58,0	52,9
FaSSIF	59,6	68,6

Tabla 44: Factor de similitud f_2 entre el producto de referencia y las formulaciones en estudio A y B de candesartán cilexetilo en aparato II a 50 r.p.m.

1.5.2. Factor de similitud f_2 . Aparato IV. 8 mL/min

En la tabla N° 45 se presentan los factores de similitud f_2 entre el producto referencia de candesartán cilexetilo y los productos en estudio del mismo fármaco A y B en los medios estudiados en el aparato IV a 8 mL/min.

f_2	A	B
pH 1.2 50 mM + pH 4.5 36.5 mM + pH 6.8 50 mM todos con Tween 20 0.20 %.	68,9	75,7
FaSSGF+FaSSIF	90,5	86,7

Tabla 45: Factor de similitud f_2 entre el producto de referencia y las formulaciones en estudio A y B de candesartán cilexetilo en aparato IV a 8 mL/min

1.6. Ensayos *in situ* para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de candesartán

En las tablas que se muestran a continuación, se presentan los resultados de los experimentos individuales realizados *in situ* con soluciones preparadas de las tres formulaciones de candesartán cilexetilo. En la gráfica N° 18 se representan las constantes de absorción de las formulaciones en estudio candesartán cilexetilo (Referencia, A y B). En la gráfica 19 se muestra la comparación de la constante de absorción entre el candesartán cilexetilo (tabla 53) y las constantes de absorción del fármaco desde las formulaciones de Referencia, A y B (tablas 46, 47 y 48).

Concentración remanente de candesartán cilexetilo en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 64 µg/mL (Referencia) Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	2,63	2,43	2,60	2,84	2,63	0,17
10	2,54	2,28	2,50	2,67	2,50	0,16
15	2,39	2,13	2,45	2,72	2,42	0,24
20	2,23	2,14	2,18	2,47	2,26	0,15
25	2,07	2,01	2,12	2,40	2,15	0,17
30	1,90	1,83	2,09	2,30	2,03	0,21
Vr(mL)	5,5	4,5	5,5	6	5,38	0,63
Ajuste no lineal						
Ka(h ⁻¹)	0,77	0,61	0,59	0,50	0,62	0,11
A _o (µg/mL)	2,85	2,54	2,75	2,96	2,78	0,18

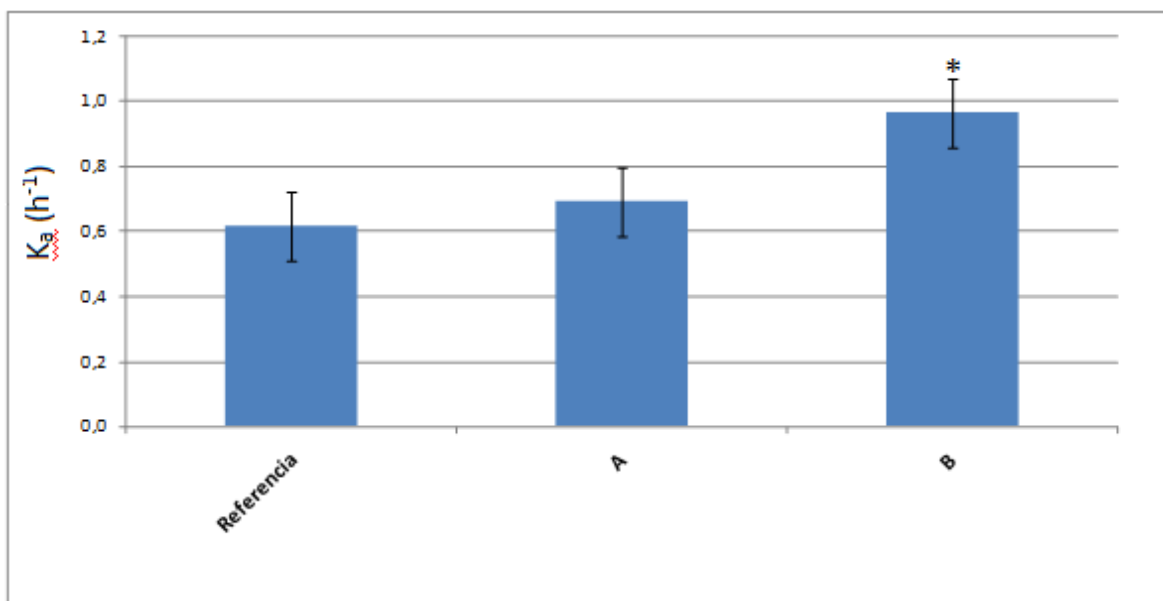
Tabla 46: Concentración de candesartán cilexetilo remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de candesartán cilexetilo a una concentración de 64 µg/mL preparada a partir del producto de Referencia

Concentración remanente de candesartán cilexetilo en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 64 µg/mL (A) Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	2,53	3,07	2,87	2,61	2,77	0,25
10	2,35	2,85	2,70	2,49	2,60	0,22
15	2,33	2,75	2,83	2,29	2,55	0,28
20	2,21	2,56	2,72	2,22	2,43	0,25
25	2,06	2,20	2,49	2,10	2,21	0,19
30	1,82	2,12	2,37	1,85	2,04	0,26
Vr(mL)	4,5	5,5	6,5	4,5	5,25	0,96
Ajuste no lineal						
Ka(h ⁻¹)	0,69	0,90	0,41	0,76	0,69	0,21
A _o (µg/mL)	2,70	3,34	3,00	2,81	2,96	0,28

Tabla 47: Concentración de candesartán cilexetilo remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de candesartán cilexetilo a una concentración de 64 µg/mL preparada a partir del producto A

Concentración remanente de candesartán cilexetilo en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 64 µg/mL (B) Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	3,17	2,80	2,70	2,55	2,81	0,26
10	3,15	2,57	2,63	2,51	2,72	0,29
15	2,81	2,27	2,26	2,19	2,38	0,29
20	2,54	2,08	2,24	2,18	2,26	0,20
25	2,39	2,07	1,97	2,00	2,11	0,19
30	2,04	1,84	1,85	1,70	1,86	0,14
Vr(mL)	5,5	4,5	5,5	5	5,13	0,48
Ajuste no lineal						
Ka(h ⁻¹)	1,03	1,00	0,94	0,89	0,97	0,06
A _o (µg/mL)	3,59	3,01	2,97	2,81	3,10	0,34

Tabla 48: Concentración de candesartán cilexetilo remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de candesartán cilexetilo a una concentración de 64 µg/mL preparada a partir del producto B



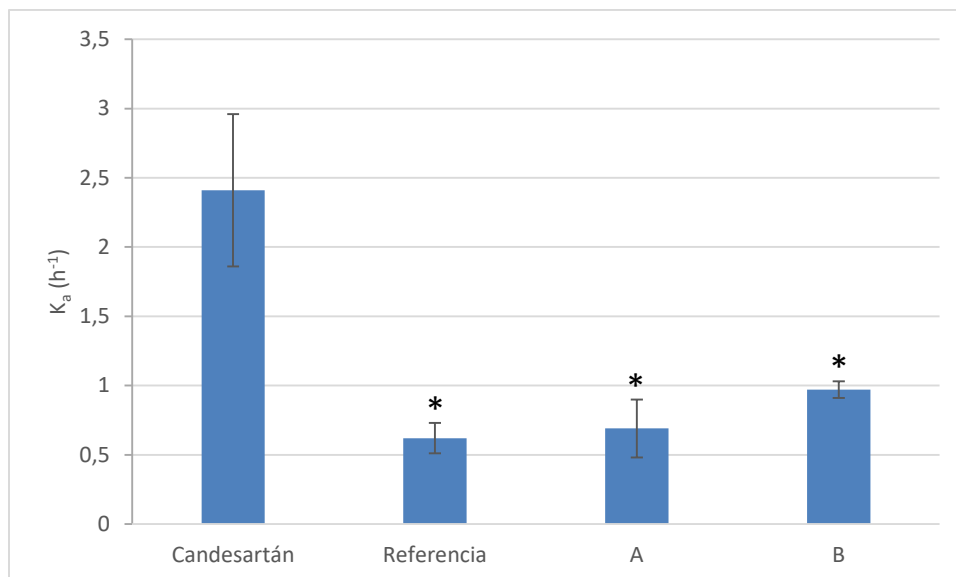
Gráfica 18: Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de las formulaciones en estudio candesartán cilexetilo (Referencia, A y B)

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	1,181	0,350	NS
ANOVA		0,016	S

Tabla 49: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a las constantes de absorción en el modelo in situ de las formulaciones en estudio candesartán cilexetilo (Referencia, A y B)

Prueba de Comparación Múltiple de Scheffé	
Formulación	Referencia
A	NS
B	S

Tabla 50: Resultado de la comparación múltiple de las constantes de absorción en el modelo in situ de las formulaciones en estudio de candesartán cilexetilo (Referencia, A y B)



Gráfica 19: Comparación de las constantes de absorción en el modelo in situ de candesartán cilexetilo y las formulaciones Referencia, A y B

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	1,642	0,228	NS
ANOVA		<0,0001	S

Tabla 51: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a las constantes de absorción en el modelo in situ de candesartán cilexetilo y las formulaciones Referencia, A y B

Prueba de Comparación Múltiple de Scheffé	
Formulación	Candesartán cilexetilo
Referencia	S
A	S
B	S

Tabla 52: Resultado de la comparación múltiple de las constantes de absorción en el modelo in situ de candesartán cilexetilo y las formulaciones Referencia, A y B

1.7. Ensayos *in situ* para determinar el efecto de los excipientes sobre la permeabilidad de candesartán cilexetilo

En las tablas que se muestran a continuación, se presentan los resultados de los experimentos individuales realizados *in situ* con soluciones de candesartán cilexetilo y soluciones del fármaco con los diferentes excipientes estudiados. En la gráfica N° 19 se representan las constantes de absorción de la sustancia activa y con excipientes.

Concentración remanente de candesartán cilexetilo en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 64 µg/mL Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	1,83	1,76	1,78	1,78	1,86	1,80	0,04
10	1,48	1,41	1,59	1,51	1,52	1,50	0,07
15	1,24	1,29	1,43	1,10	1,30	1,27	0,12
20	1,07	1,04	1,21	0,87	1,05	1,05	0,12
25	0,85	0,79	1,06	0,63	0,81	0,83	0,15
30	0,65	0,57	0,86	0,39	0,59	0,61	0,17
Vr(mL)	2,5	2	3,5	1	2	2,20	0,91
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	2,32	2,40	1,65	3,20	2,50	2,41	0,55
A ₀ (µg/mL)	2,21	2,18	2,08	2,42	2,32	2,24	0,13

Tabla 53: Concentración de candesartán cilexetilo remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de candesartán cilexetilo a una concentración de 64 µg/mL

Concentración remanente de candesartán cilexetilo en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: candesartán cilexetilo (64 µg/mL)+lactosa (0,22 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	3,15	1,66	5,29	11,36	12,86	6,86	4,99
10	2,34	1,54	4,76	10,62	12,45	6,34	4,93
15	1,81	1,40	4,27	9,37	11,60	5,69	4,58
20	1,26	1,21	3,75	8,29	10,26	4,95	4,14
25	0,96	1,06	3,15	6,92	9,15	4,25	3,65
30	0,74	0,90	2,62	5,86	8,24	3,67	3,28
Vr(mL)	3	4	4	5	7	4,60	1,52
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	3,52	1,41	1,59	1,53	1,08	1,83	0,97
A ₀ (µg/mL)	4,23	1,92	6,17	13,35	14,56	8,05	5,62

Tabla 54: Concentración de candesartán cilexetilo remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de candesartán cilexetilo a una concentración de 64 µg/mL en presencia de lactosa a concentración de 0,22 mg/mL

Concentración remanente de candesartán cilexetilo en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: candesartán cilexetilo (64 µg/mL)+lactosa (0,64 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	3,77	2,02	4,04	3,47	4,55	3,57	0,95
10	3,07	1,96	3,86	2,50	4,38	3,16	0,98
15	2,57	1,57	2,55	1,51	2,83	2,21	0,62
20	1,80	1,38	1,55	1,33	2,07	1,63	0,31
25	1,50	1,05	1,19	1,21	1,06	1,20	0,18
30	1,34	0,94	1,10	1,09	0,92	1,08	0,17
Vr(mL)	4	4	5	5	4	4,40	0,55
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	2,67	1,88	3,44	3,44	3,63	3,01	0,73
A ₀ (µg/mL)	4,76	2,49	5,81	4,45	6,74	4,85	1,60

Tabla 55: Concentración de candesartán cilexetilo remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de candesartán cilexetilo a una concentración de 64 µg/mL en presencia de lactosa a concentración de 0,64 mg/mL

Concentración remanente de candesartán cilexetilo en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: candesartán cilexetilo (64 µg/mL)+macrogol (0,008 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	2,51	2,40	3,12	13,53	2,04	4,72	4,94
10	2,42	2,36	3,05	9,28	1,88	3,80	3,09
15	2,32	1,77	2,12	7,70	1,55	3,09	2,59
20	1,70	1,69	1,95	6,97	1,49	2,76	2,36
25	1,37	1,61	1,25	5,96	1,38	2,32	2,04
30	0,73	1,59	1,12	4,86	0,99	1,86	1,71
Vr(mL)	3	7,5	5	4	3	4,50	1,87
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	2,15	1,20	2,50	2,50	1,49	1,97	0,59
A ₀ (µg/mL)	3,31	2,66	4,10	15,61	2,35	5,61	5,63

Tabla 56: Concentración de candesartán cilexetilo remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de candesartán cilexetilo a una concentración de 64 µg/mL en presencia de macrogol a concentración de 0,008 mg/mL

Concentración remanente de candesartán cilexetilo en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: candesartán cilexetilo (64 µg/mL)+hidroxipropilcelulosa (0,013 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	2,49	1,95	2,87	3,05	2,45	2,56	0,43
10	2,28	1,84	2,70	2,80	2,46	2,42	0,38
15	2,07	1,69	2,67	2,58	2,04	2,21	0,41
20	1,90	1,54	2,22	2,58	2,00	2,05	0,39
25	1,83	1,58	2,10	2,44	1,91	1,97	0,32
30	1,69	1,42	2,14	2,42	1,71	1,88	0,40
Vr(mL)	5	7	10	7,5	6	7,10	1,88
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	0,94	0,74	0,83	0,56	0,88	0,79	0,15
A ₀ (µg/mL)	2,66	2,06	3,10	3,10	2,69	2,72	0,43

Tabla 57: Concentración de candesartán cilexetilo remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de candesartán cilexetilo a una concentración de 64 µg/mL en presencia de hidroxipropilcelulosa a concentración de 0,013 mg/mL

Concentración remanente de candesartán cilexetilo en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: candesartán cilexetilo (64 µg/mL)+almidón (0,064 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	2,89	2,29	2,56	3,08	2,36	2,64	0,34
10	2,76	2,20	2,56	2,99	2,34	2,57	0,32
15	2,83	1,96	2,24	2,96	2,29	2,46	0,42
20	2,35	1,93	2,11	2,86	2,24	2,30	0,35
25	2,00	1,92	2,11	2,77	2,16	2,19	0,34
30	1,30	1,57	1,94	1,79	1,98	1,72	0,28
Vr(mL)	4	7	6	7	6	6,00	1,22
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,44	0,76	0,71	0,85	0,37	0,83	0,39
A ₀ (µg/mL)	3,52	2,46	2,75	3,49	2,48	2,94	0,53

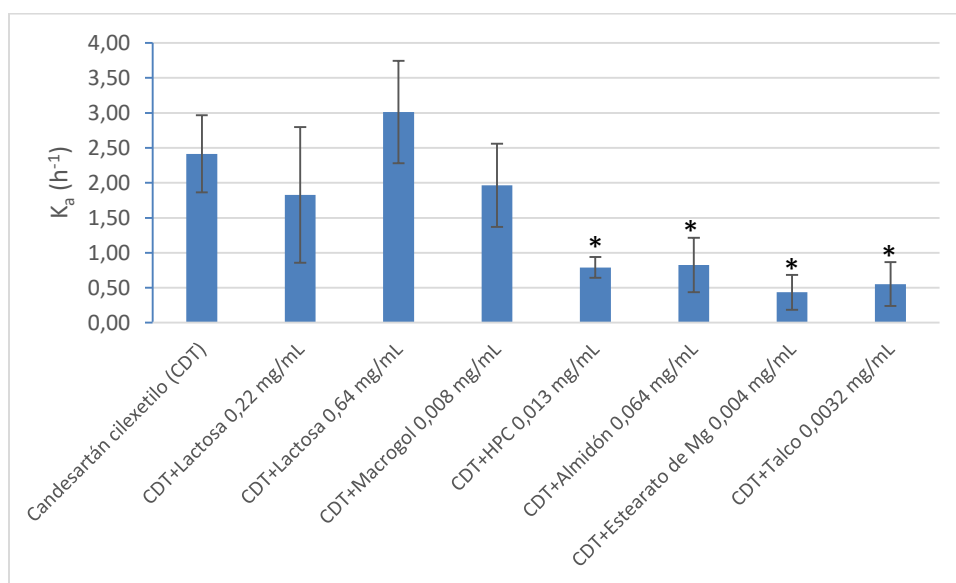
Tabla 58: Concentración de candesartán cilexetilo remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de candesartán cilexetilo a una concentración de 64 µg/mL en presencia de almidón a concentración de 0,064 mg/mL

Concentración remanente de candesartán cilexetilo en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: candesartán cilexetilo (64 µg/mL)+estearato de magnesio (0,004 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	2,85	2,22	2,31	1,72	1,91	2,20	0,43
10	2,58	2,06	2,28	1,71	1,81	2,09	0,35
15	2,39	2,00	2,27	1,69	1,74	2,02	0,31
20	2,30	1,92	2,26	1,68	1,68	1,97	0,30
25	2,26	1,88	2,25	1,67	1,53	1,92	0,33
30	2,06	1,85	1,96	1,63	1,46	1,79	0,24
Vr(mL)	8,8	7	9,6	8	6	7,88	1,43
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	0,72	0,42	0,28	0,12	0,63	0,43	0,25
A ₀ (µg/mL)	2,96	2,24	2,40	1,74	2,02	2,27	0,46

Tabla 59: Concentración de candesartán cilexetilo remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de candesartán cilexetilo a una concentración de 64 µg/mL en presencia de estearato de magnesio a concentración de 0,0042 mg/mL

Concentración remanente de candesartán cilexetilo en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: candesartán cilexetilo (64 µg/mL)+talco (0,0032 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	3,37	2,04	2,02	1,67	2,13	2,25	0,65
10	3,25	1,97	1,94	1,66	2,09	2,18	0,62
15	3,06	1,90	1,88	1,60	2,04	2,10	0,56
20	2,96	1,88	1,82	1,54	1,91	2,02	0,54
25	2,26	1,83	1,76	1,42	1,85	1,82	0,30
30	2,13	1,83	1,70	1,32	1,79	1,75	0,29
Vr(mL)	7,5	7,5	8	6	7	7,20	0,76
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,08	0,27	0,41	0,55	0,44	0,55	0,31
A ₀ (µg/mL)	3,85	2,06	2,09	1,80	2,23	2,41	0,82

Tabla 60: Concentración de candesartán cilexetilo remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de candesartán cilexetilo a una concentración de 64 µg/mL en presencia de talco a concentración de 0,0032 mg/mL



Gráfica 20: Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de candesartán cilexetilo y los excipientes de las formulaciones en estudio

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	2,131	0,069	NS
ANOVA		<0,0001	S

Tabla 61: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a las constantes de absorción en el modelo in situ de candesartán cilexetilo y los excipientes de las formulaciones en estudio

Prueba de Comparación Múltiple de Scheffé de las constantes de velocidad de absorción	
Con excipiente	Candesartán cilexetilo sin excipientes
Lactosa 0,22 mg/mL	NS
Lactosa 0,64 mg/mL	NS
Macrogol	NS
Hidroxipropilcelulosa	S
Almidón	S
Estearato de Magnesio	S
Talco	S

Tabla 62: Resultado de la comparación múltiple de las constantes de absorción en el modelo in situ de candesartán cilexetilo en disolución sólo y en presencia de los excipientes de las formulaciones en estudio

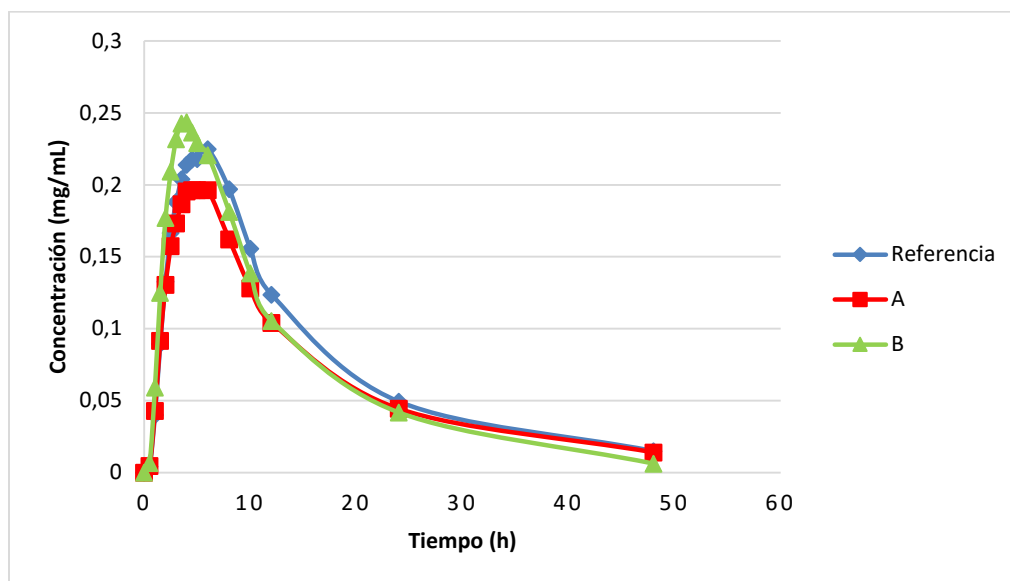
1.8. Correlación *In vivo*-*In vitro* para candesartán

1.8.1. Ensayo de bioequivalencia *in vivo*

En la tabla 63 y gráfica 21 se muestran los perfiles de concentración plasmática en función del tiempo que fueron obtenidos en los estudios de bioequivalencia *in vivo*. Estos estudios fueron independientes (realizados por dos laboratorios farmacéuticos distintos) y por tanto, se contaba con resultados del producto de Referencia-A y otros de Referencia-B y por ello fue necesario escalar en magnitud los datos de la formulación B en función de las Cp de la Referencia en los dos estudios, para que los resultados fueran equivalentes a los que se hubiesen obtenidos en el estudio de Referencia-A.

Tiempo (h)	Referencia	A	B
	Cp (mg/L)	Cp (mg/L)	Cp (mg/L)
0	0	0	0
0,5	0,0042	0,0045	0,0065
1	0,0400	0,0428	0,0591
1,5	0,0893	0,0916	0,1249
2	0,1327	0,1304	0,1770
2,5	0,1666	0,1573	0,2093
3	0,1880	0,1733	0,2318
3,5	0,2039	0,1865	0,2427
4	0,2139	0,1954	0,2434
4,5	0,2178	0,1963	0,2364
5	0,2180	0,1963	0,2290
6	0,2247	0,1963	0,2206
8	0,1969	0,1620	0,1813
10	0,1556	0,1281	0,1384
12	0,1236	0,1040	0,1054
24	0,0493	0,0443	0,0417
48	0,0149	0,0140	0,0062

Tabla 63: Concentración plasmática de candesartán cilexetilo en función del tiempo (Cp-t) del estudio de bioequivalencia in vivo

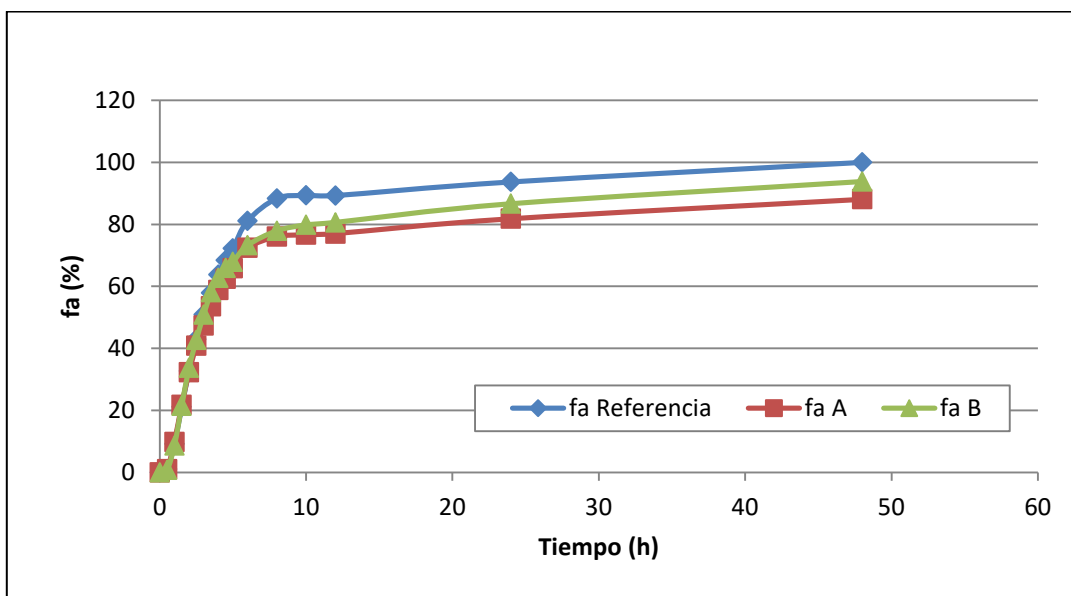


Gráfica 21: Perfiles de Cp-t de candesartán cilexetilo de las formulaciones en estudio (Referencia, A y B)

1.8.2. Perfil de absorción según el modelo de Loo-Riegelman

En la gráfica 22 se pueden observar los perfiles de fracción absorbida en función del tiempo (f_a -t) obtenidos empleando el modelo de Loo-Riegelman. En la tabla 64 se muestran los

mismos resultados.



Gráfica 22: Perfiles de f_a -t de las formulaciones de candesartán cilexetilo en estudio (Referencia, A y B) obtenidas por el modelo de Loo-Riegelman

Tiempo (h)	Referencia	A	B
	f_a (%)	f_a (%)	f_a (%)
0	0,00	0,00	0,00
0,5	0,96	1,03	0,79
1	9,18	9,81	8,64
1,5	21,15	21,74	21,41
2	32,72	32,28	33,74
2,5	42,91	40,86	42,76
3	50,85	47,38	50,82
3,5	57,89	53,51	58,12
4	63,80	58,86	62,74
4,5	68,43	62,47	65,94
5	72,24	65,84	67,91
6	81,12	72,39	73,25
8	88,38	76,04	77,93
10	89,32	76,65	79,84
12	89,29	77,03	80,64
24	93,68	81,81	86,66
48	100,00	88,07	93,83

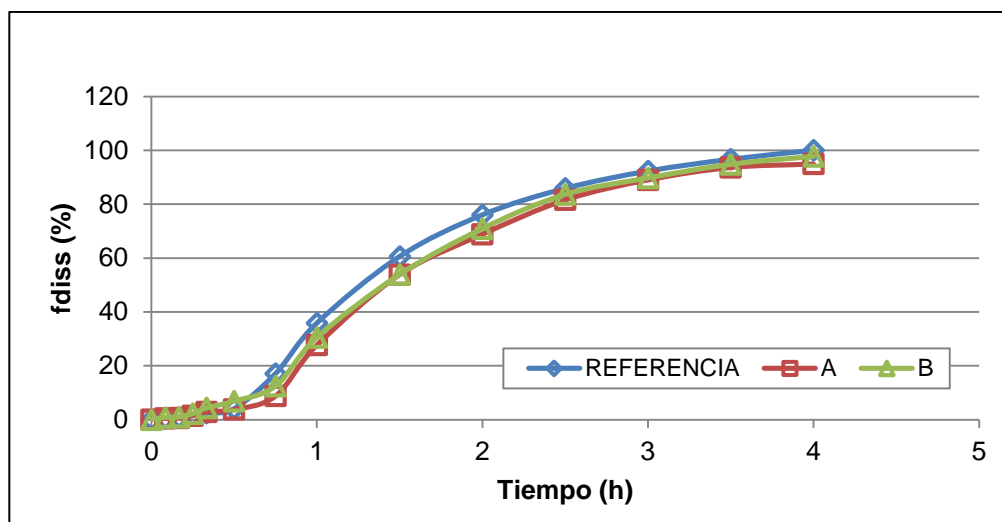
Tabla 64: Perfiles f_a -t del estudio de bioequivalencia in vivo obtenidos con el modelo de Loo-Riegelman para candesartán cilexetilo

1.8.3. Escalado del perfil de disolución *in vitro*

De las diferentes condiciones de ensayo empleadas para estudiar los perfiles de disolución de las formulaciones estudiadas de candesartán cilexetilo, se seleccionó como predictivo el ensayo realizado en el aparato IV con medios de pH 1,2; 4,5 y 6,8 adicionados con 0,20% de Tween 20, cuyos resultados se pueden observar en la tabla 42 y gráfica 16 (mostradas anteriormente). Como se puede observar en la gráfica 17, ningún perfil de disolución alcanza el 100%, pero todos muestran una asíntota, por lo que se pudo realizar un escalado en magnitud, considerando la fracción disuelta más alta como 100%. Esto se hizo con la finalidad de hacer comparables los perfiles f_a-t con los perfiles $f_{diss}-t$ y poder realizar la correlación. En la tabla 65 y gráfica 23 se muestran los perfiles con las f_{diss} escaladas.

Tiempo (min)	Tiempo (h)	Referencia	A	B
		f_{diss} (%)	f_{diss} (%)	f_{diss} (%)
0	0	0,00	0,00	0,00
5	0,08	0,56	0,53	0,90
10	0,16	0,91	0,64	1,02
15	0,25	1,71	1,50	2,29
20	0,33	2,48	2,92	4,37
30	0,50	4,09	3,77	6,88
45	0,75	17,12	8,77	12,50
60	1,00	35,89	27,68	30,57
90	1,50	60,62	53,86	53,93
120	2,00	76,06	68,86	70,99
150	2,50	85,88	81,60	83,65
180	3,00	92,30	89,03	89,74
210	3,50	96,70	93,63	94,80
240	4,00	100,00	94,91	97,77

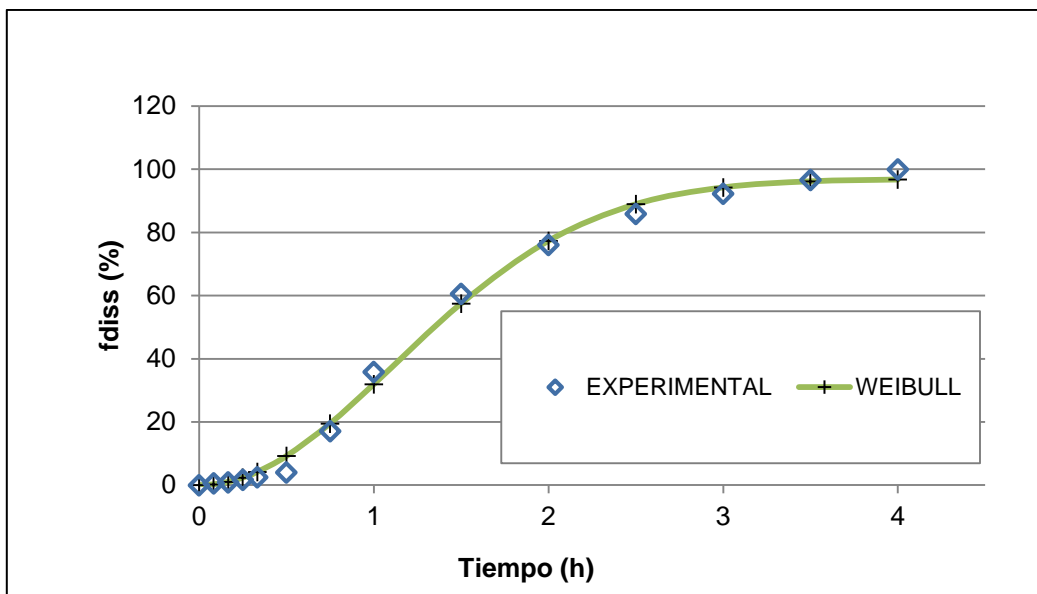
Tabla 65: Perfiles $f_{diss}-t$ de candesartán cilexetilo del ensayo de disolución *in vitro* en los medios pH 1,2 50 mM + pH 4,5 36,5 mM + pH 6,8 50 mM todos con Tween 20 0,20% empleando el aparato IV, tras el escalado en magnitud



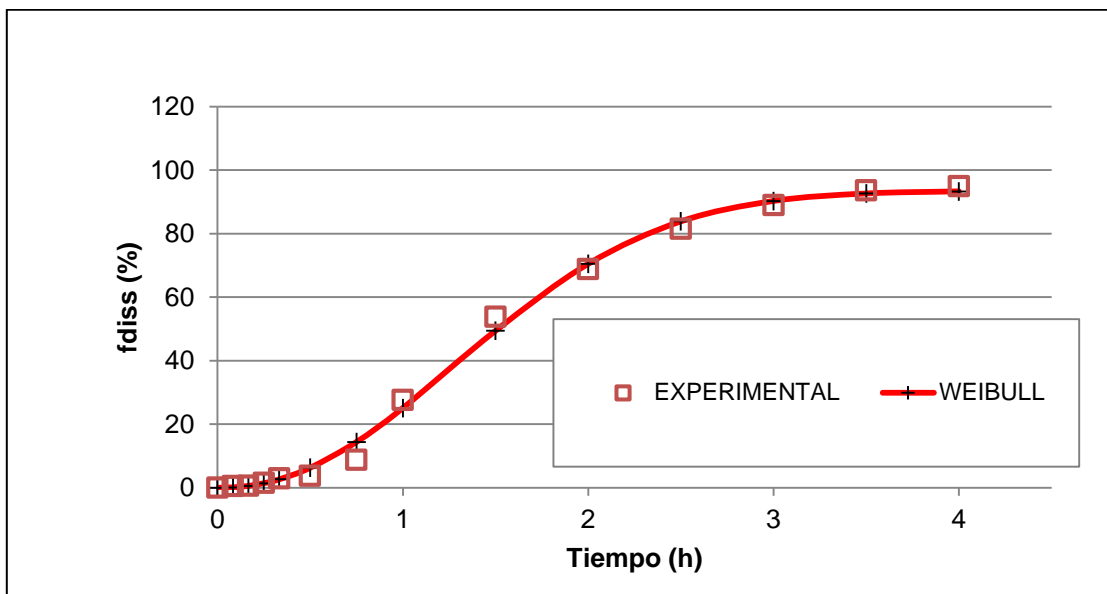
Gráfica 23: Perfiles $f_{diss}-t$ escalados en magnitud de las formulaciones en estudio (Referencia, A y B) obtenidos en los medios pH 1,2 50 mM + pH 4,5 36,5 mM + pH 6,8 50 mM todos con Tween 20 0,20% empleando el aparato IV

1.8.4. Perfil de disolución ajustado al modelo de Weibull

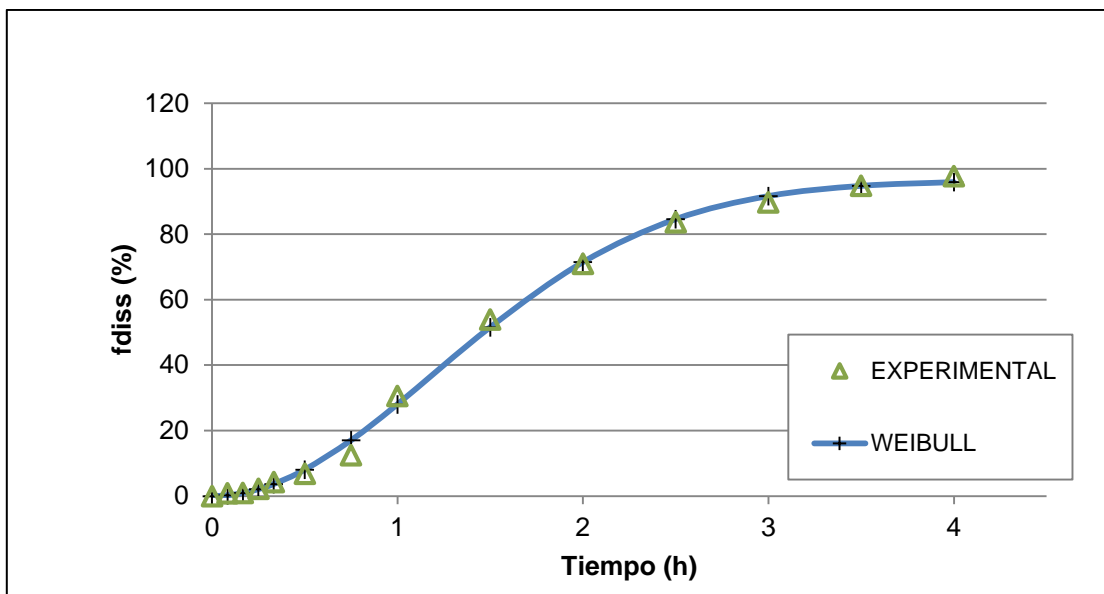
En las gráficas de la 24 a la 26 se muestran los perfiles de disolución ajustados al modelo de Weibull para el producto de Referencia y las formulaciones A y B, respectivamente. En la tabla 66 se muestran las ecuaciones de ajustado para cada formulación estudiada siguiendo el modelo de Weibull.



Gráfica 24: Ajustado del perfil de disolución in vitro para el producto de Referencia de candesartán cilexetilo según el modelo de Weibull



Gráfica 25: Ajustado de los perfiles de disolución in vitro para la formulación A de candesartán cilexetilo según el modelo de Weibull



Gráfica 26: Ajustado de los perfiles de disolución in vitro para la formulación B de candesartán cilexetilo según el modelo de Weibull

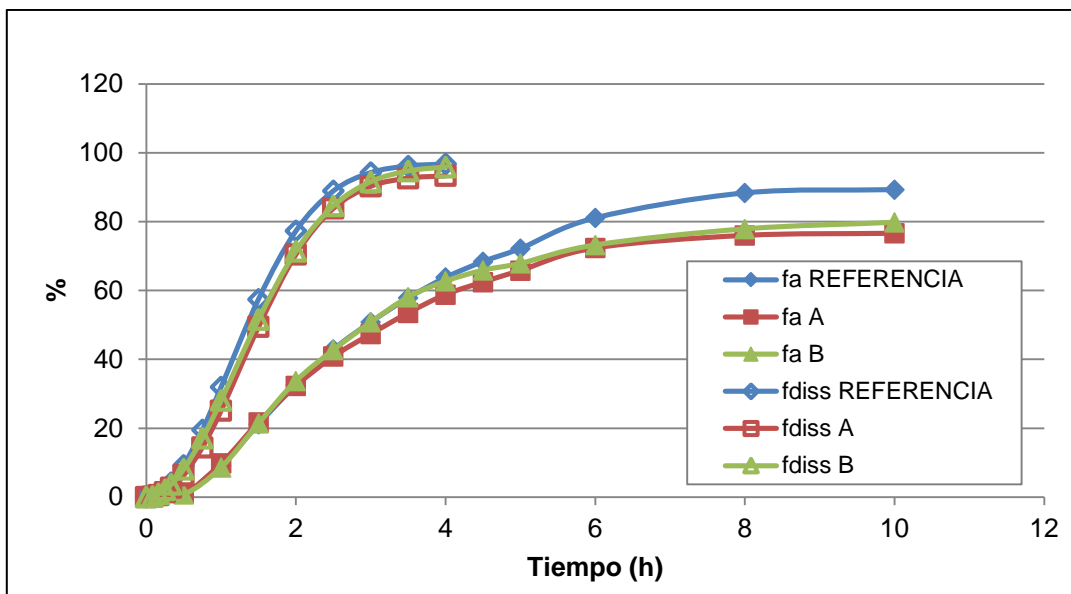
Formulación	Ecuación de ajustado según Weibull
Referencia	$f_{diss_t} = 96,93 \cdot \left(1 - e^{\left(\frac{-t^{1,999}}{2,499} \right)} \right)$
A	$f_{diss_t} = 93,50 \cdot \left(1 - e^{\left(\frac{-t^{2,165}}{3,197} \right)} \right)$
B	$f_{diss_t} = 96,38 \cdot \left(1 - e^{\left(\frac{-t^{1,975}}{2,905} \right)} \right)$

Tabla 66: Ecuaciones de ajustado de los perfiles de disolución de candesartán cilexetilo para las formulaciones estudiadas según la ecuación de Weibull

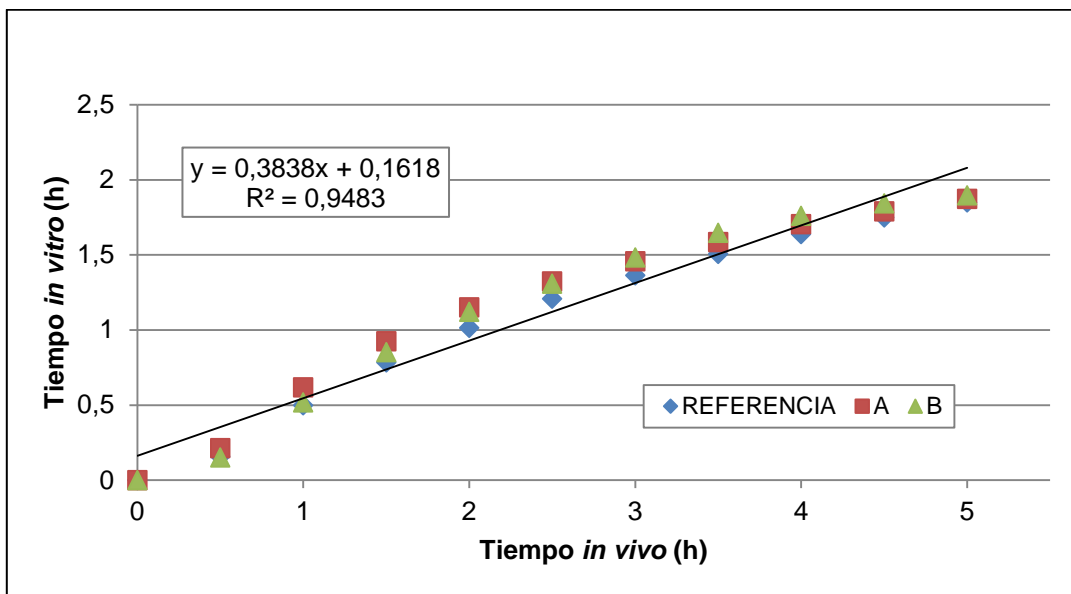
1.8.5. Levy Plot

En la gráfica N° 27 se muestran los perfiles de absorción *in vivo* y los perfiles de disolución *in vitro*. En la gráfica N°28 se muestra el Levy plot o escalado de tiempo y en ella pueden observar los tiempos *in vivo* y los tiempos *in vitro* en los que las f_a y las f_{diss} , respectivamente, son iguales. De esta gráfica se obtiene la ecuación para escalar el tiempo y es:

$$t_{vitro} = 0,161 + 0,383 \cdot t_{vivo}$$

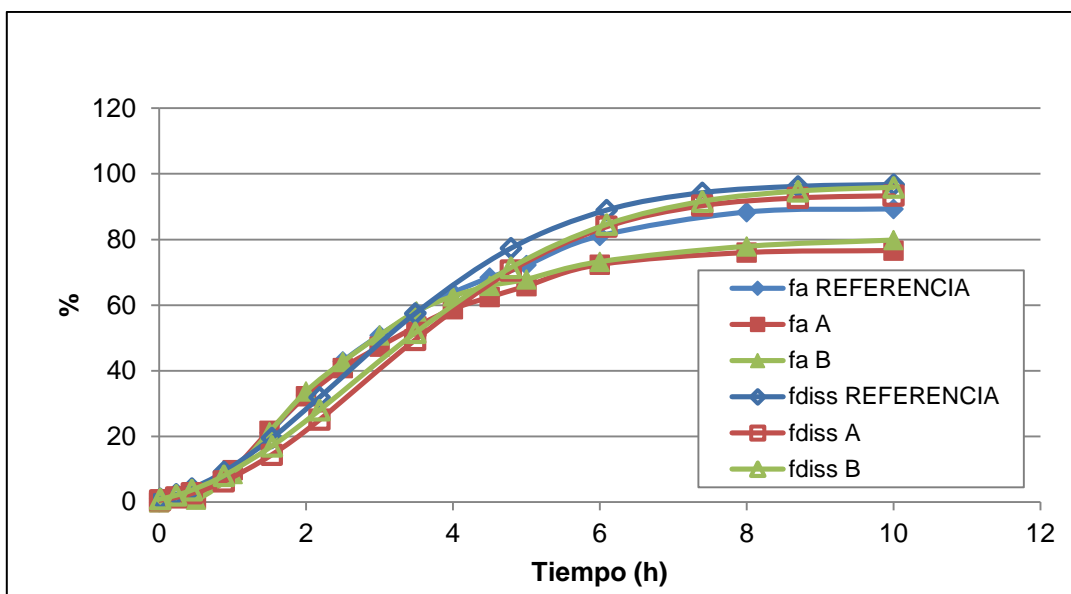


Gráfica 27: Perfiles f_a-t y $f_{diss}-t$ de las formulaciones ensayadas de candesartán cilexetilo sin escalado de tiempo (hasta $t= 10$ h)



Gráfica 28: Levy plot o escalado de tiempo

En la gráfica N°29 se muestran los perfiles de absorción *in vivo* y los perfiles de disolución *in vitro* con el ajustado de tiempo que permite hacer superponible ambas curvas.

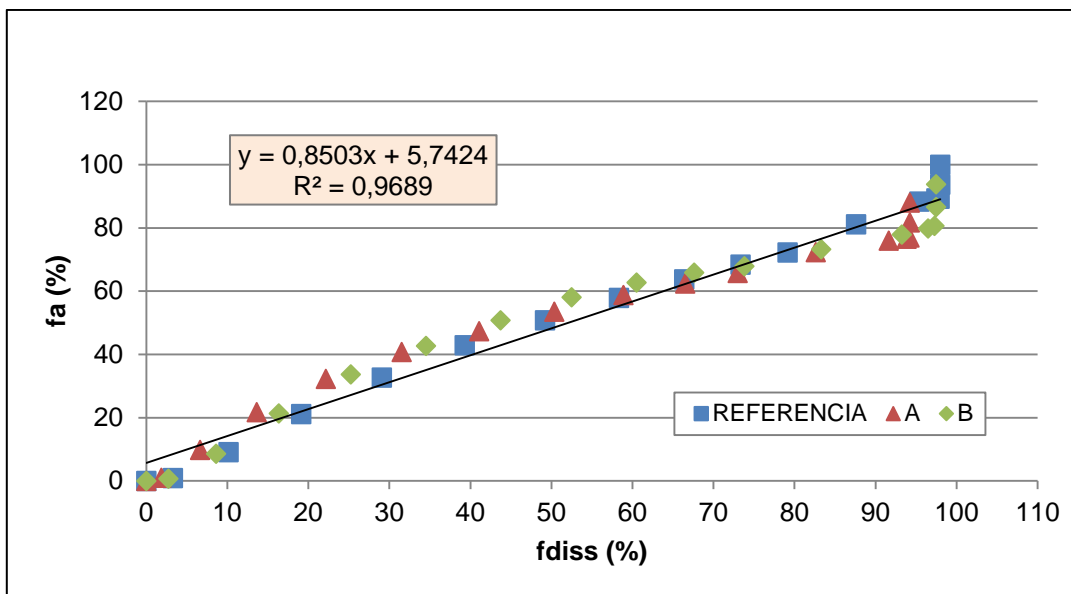


Gráfica 29: Perfiles f_a -t y f_{diss} -t de las formulaciones ensayadas de candesartán cilexetilo con el tiempo escalado (hasta t= 10 h)

1.8.6. Recta de correlación

Posterior a tener perfiles de absorción y disolución superponibles (en magnitud y escala temporal), se realizó la CIVIV, representando en una misma gráfica las f_{diss} y las f_a a los mismos tiempos. En la gráfica 30 se muestra la correlación, de donde proviene la ecuación que representa dicha relación:

$$f_a = 5,742 + 0,850 \cdot f_{diss}$$



Gráfica 30: Correlación in vivo-in vitro

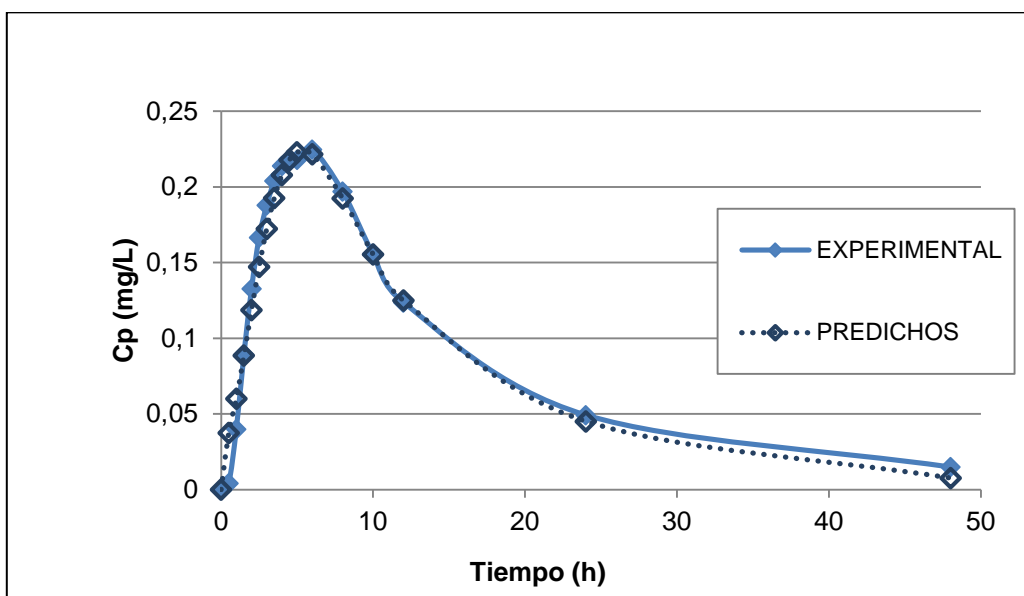
1.8.7. Grado de predictibilidad de la correlación

Al realizar una reconvolución de los perfiles f_a -t predichos con la CIVIV a partir de los valores de f_{diss} usados para establecer la correlación, se obtuvieron nuevos perfiles C_p -t predichos. Los resultados del procedimiento antes descrito se muestran en la tabla 67. Los resultados de la tabla antes señalada pueden ser observados en las gráficas de la 31 a la 33.

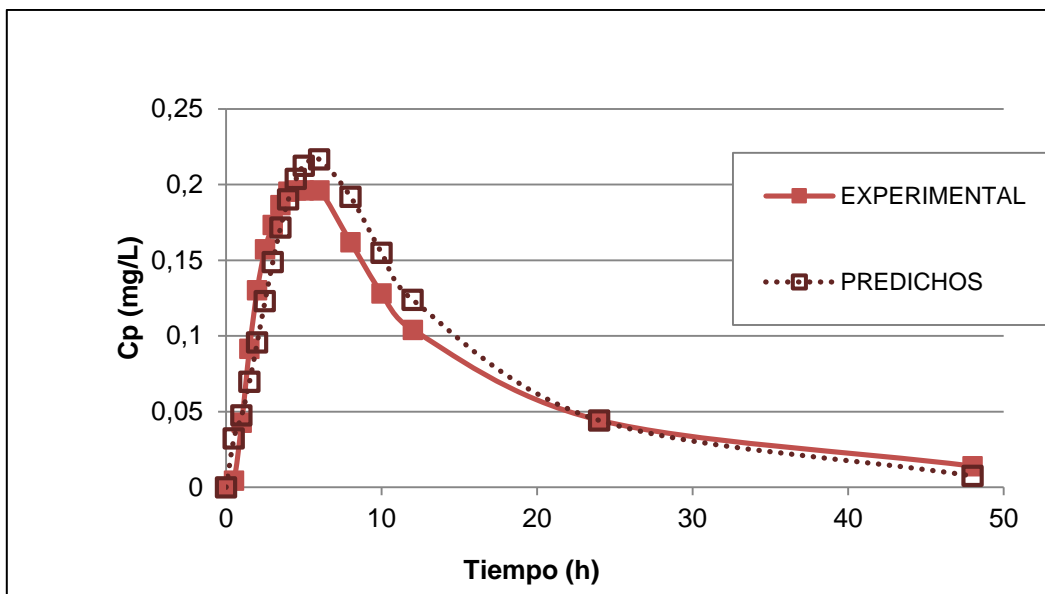
Tiempo (h)	Referencia	A	B
	Cp Pred (mg/L)	Cp Pred (mg/L)	Cp Pred (mg/L)

0	0	0	0
0,5	0,0375	0,0322	0,0355
1	0,0601	0,0474	0,0545
1,5	0,0885	0,0696	0,0790
2	0,1186	0,0958	0,1056
2,5	0,1472	0,1229	0,1318
3	0,1724	0,1488	0,1556
3,5	0,1928	0,1716	0,1760
4	0,2079	0,1901	0,1922
4,5	0,2179	0,2037	0,2040
5	0,2230	0,2124	0,2115
6	0,2216	0,2166	0,2154
8	0,1925	0,1919	0,1945
10	0,1555	0,1548	0,1602
12	0,1250	0,1237	0,1293
24	0,0452	0,0441	0,0459
48	0,0077	0,0075	0,0077

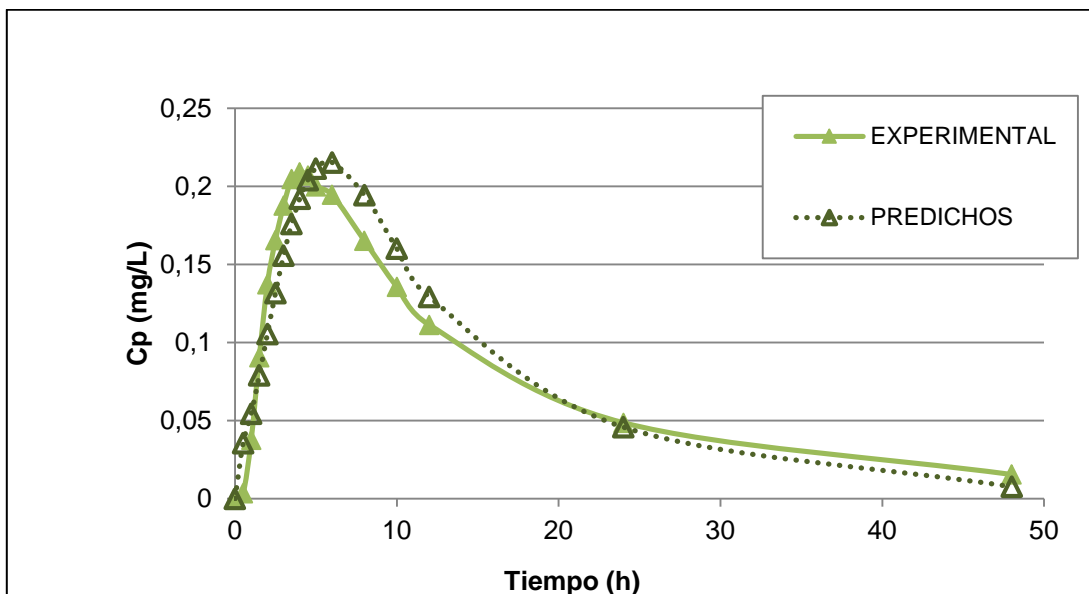
Tabla 67: Perfiles de Cp-t de candesartán cilexetilo predichos a partir de la CIVIV para las tres formulaciones estudiadas



Gráfica 31: Comparación de los perfiles de Cp-t de candesartán cilexetilo experimentales y predichos por la CIVIV para el producto Referencia



Gráfica 32: Comparación de los perfiles de Cp-t de candesartán cilexetilo experimentales y predichos por la CIVIV para la formulación A



Gráfica 33: Comparación de los perfiles de Cp-t de candesartán cilexetilo experimentales y predichos por la CIVIV para la formulación B

En la tabla 68 se muestran los resultados de la validación de la CIVIV.

Formulación	AUC _{0-t}			Cmax		
	Experimental	Predicha	%EP	Experimental	Predicha	%EP
Referencia	3,765	3,597	4,48	0,225	0,223	0,76
A	3,303	3,468	5,00	0,196	0,217	10,33
B	3,508	3,581	2,09	0,209	0,215	3,06
Total			3,86			4,71

Tabla 68: Validación interna de la CIVIV

2. Valsartán

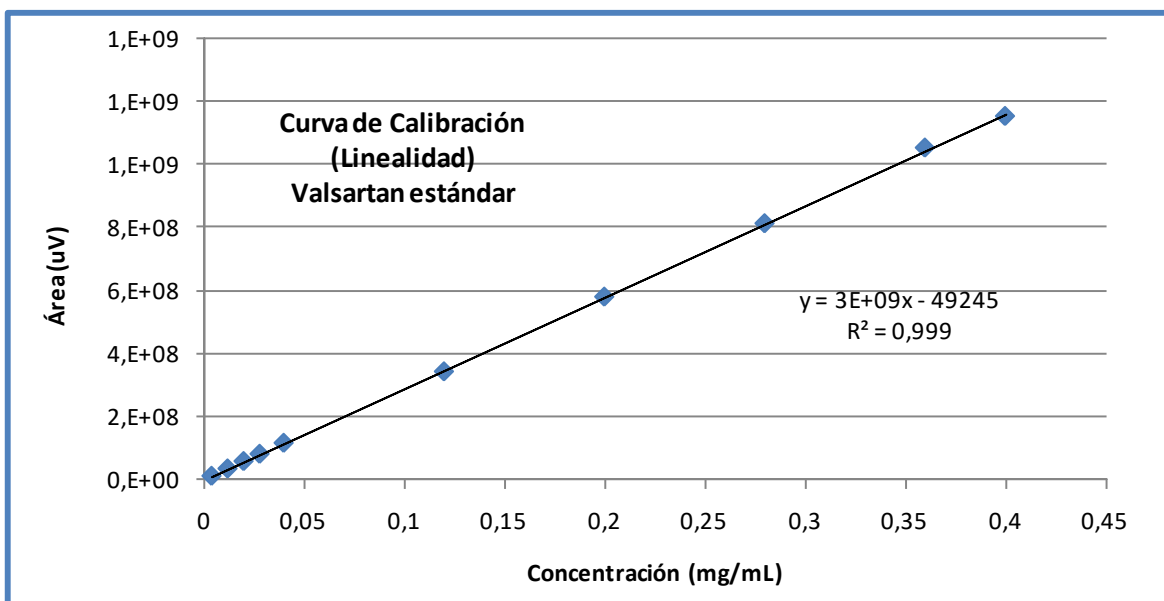
2.1. Validación del método analítico para valsartán

2.1.1. Linealidad

Se realizó el estudio de linealidad a la curva de calibración utilizada. A continuación se muestra en la gráfica N° 34 la linealidad y en la tabla N° 69 los datos de este análisis.

Linealidad	Criterios de aceptación			
Coeficiente de correlación r	0,99996			
Coeficiente de determinación r ²	0,99991		Cumple r ² ≥ 0,99	
Error típico S _{y/x}	4372433			
Nº determinaciones	10			
Pendiente	2901038408			
Intercepción eje Y	-492451			
DE del intercepto S _a	1963077			
t de student (n-2)	2,3060			
Límite de detección	0,0022			
Límite de cuantificación	0,0068			
Media ± DE (factores de respuesta)	289233907596 ± 2332512229			
CV % factores de respuesta	0,81		Cumple CV % ≤ 2%	
Intervalo de confianza del intercepto eje Y	4526863	Valor min.	Valor máx.	Cumple: Intervalo de confianza del intercepto incluye el cero
		-5019314	4034412	

Tabla 69: Resultados de la prueba de linealidad y criterios de aceptación para valsartán



Gráfica 34: Curva de calibración valsartán, linealidad

2.1.2. Exactitud

En la tabla N° 70 se muestran los promedios de errores relativos y porcentaje de recuperación de los tres niveles de los ensayos realizados para valsartán.

Exactitud	Nivel 1 (5%)	Nivel 2 (50%)	Nivel 3 (100%)	Criterios de aceptación	
Er	1,05	0,088	0,22	Er < 2	Cumple
% Recuperación	99,79	100,17	100,65	% R: 95-105	Cumple

Tabla 70: Resultados de la prueba de exactitud y criterios de aceptación para valsartán

2.1.3. Precisión (repetibilidad) y precisión intermedia

En la tabla N° 71 se muestran los CV % de la repetibilidad.

Exactitud	5%	50%	100%	Criterios de aceptación	
% CV	1,42	0,76	0,18	CV % < 2	Cumple

Tabla 71: Resultados de los análisis de repetibilidad para valsartán

Para la precisión intermedia se aplicó el “Test de comparación de medias” (t-student porque

las varianzas son iguales) cuyos resultados se muestran en la tabla 72.

Puntos	5%		50%		100%	
Parámetros	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Media	99,94	99,23	100,89	100,01	101,56	101,48
Varianza	0,02	0,04	0,03	0,05	0,06	0,05
Comparación de Varianzas						
F critico (tabla)	4,28		4,28		4,28	
F calculado	1,75		1,667		1,289	
Varianza común	0,0275		0,0400		0,0520	
Varianzas iguales						
Estadístico t exp.	1,7157		2,1137		0,1911	
Valor critico de t (2 colas)	2,2281		2,2281		2,2281	
Calificación t	Cumple		Cumple		Cumple	

Tabla 72: Resumen de parámetros y comparación de varianzas para la aplicación del test de comparación de medias en el análisis de precisión intermedia

2.1.4. Estabilidad

En la tabla 73 se muestran los resultados del % de recuperación de las muestras de valsartán que fueron almacenaron a temperatura ambiente (20°C) y refrigeradas (5°C) a las 24 y 48 horas.

Estabilidad	Día 1		Día 2		
Temperatura	5°C	20°C	5°C	20°C	
% Recuperación	99,26	99,56	101,15	99,66	Cumple

Tabla 73: Resultados de la prueba de estabilidad para valsartán

2.1.5. Influencia de filtro

Se obtuvo un porcentaje de recuperación de 99,6% en la prueba con una solución al 100% para ver la influencia de filtro, por lo tanto **Cumple**.

2.1.6. Especificidad

La interferencia encontrada en la metodología que cuantifica al principio activo es menor al 2% y la misma cuantifica valsartán de forma específica y selectivamente, por lo tanto **Cumple**.

2.1.7. Robustez

Para evaluar la robustez dentro de los rangos establecidos de prueba, se seleccionó como parámetro el tailing y los factores modificados fueron flujo y composición del medio.

En la tabla N° 74 se presentan los resultados de robustez.

Factor	Efecto (Tailing)	IC (factor $\pm t^*/\sqrt{n}$)	
Flujo	0,02	0,0202 – (- 0,0102)	Cumple
Composición del medio	0,01	00302 – (- 0,0002)	Cumple

Tabla 74: Resultados de la prueba de robustez para valsartán

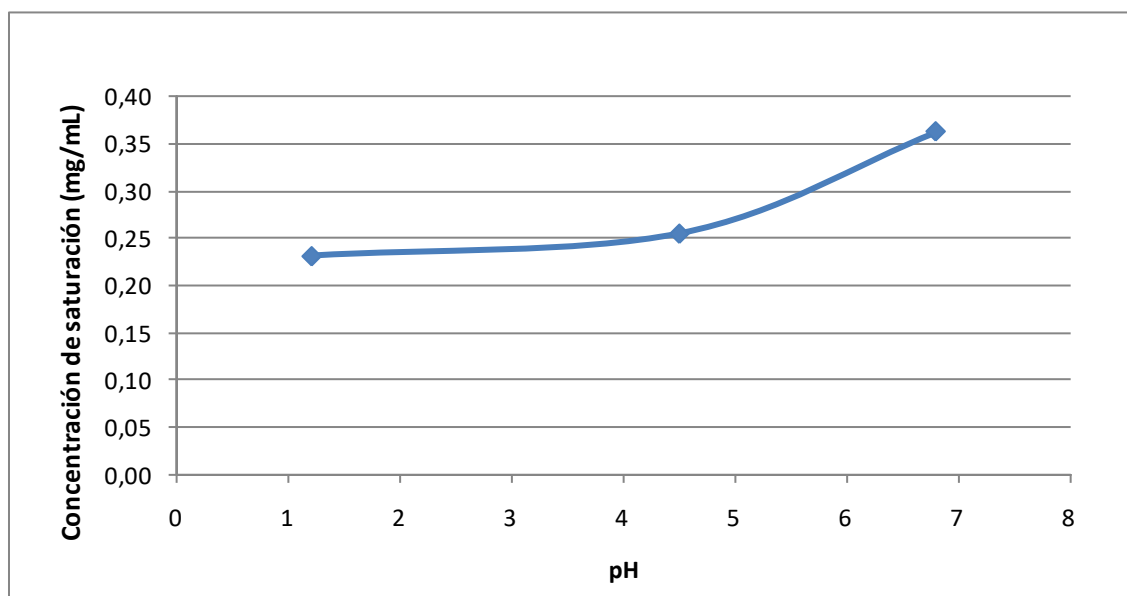
2.2. Concentración de saturación de valsartán

2.2.1. Medios de disolución biofarmacéuticos

En la gráfica N° 35 se muestra el perfil de solubilidad-pH para valsartán, cuyos datos tabulados se pueden observar en la tabla N° 75 en donde se muestran las concentraciones experimentales en condición de saturación de valsartán individualmente y promedio en cada pH estudiado en 24 horas a 37°C.

pH	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
1,2	0,2322	0,2315	0,0006	0,25	5,53
	0,2313				
	0,2311				
4,5	0,2548	0,2553	0,0004	0,17	5,01
	0,2556				
	0,2555				
6,8	0,3634	0,3635	0,0003	0,08	3,52
	0,3638				
	0,3632				

Tabla 75: Concentración de saturación de valsartán a los distintos pH estudiados



Gráfica 35: Perfil en función del pH de valsartán a 37°C

2.2.2. Medios de disolución biopredictivos

En la tabla N° 76 se muestran las concentraciones experimentales de valsartán, individuales y promedio, en condición de saturación a partir de valsartán en medios biopredictivos FaSSIF y FaSSGF en 24 horas a 37°C.

Medio	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
FaSSGF	0,4499	0, 4498	0,0007	0,15	2,85
	0,4491				
	0,4504				
FaSSIF	0,5314	0,5317	0,0004	0,07	2,41
	0,5321				
	0,5317				

Tabla 76: Concentración de saturación de valsartán en medios biopredictivos

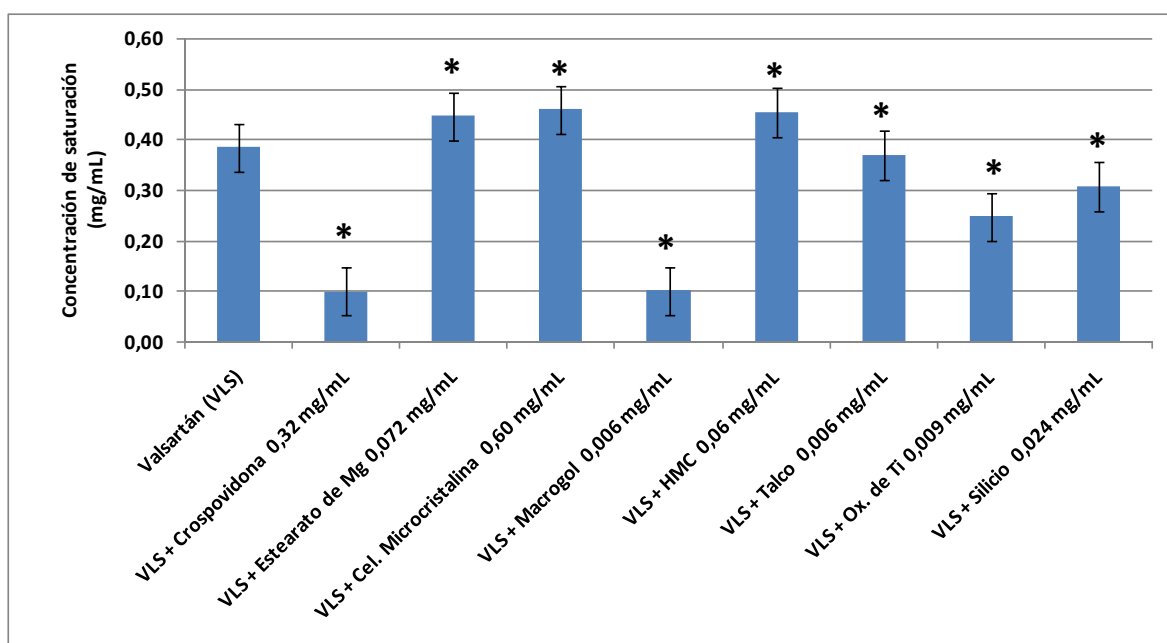
2.2.3. Excipientes

En la tabla N° 77 se muestran las concentraciones experimentales en condición de saturación de valsartán, individuales y promedio, a partir del principio activo en presencia de cada excipiente en 24 horas a 37°C; como medio de disolución se utilizó agua. En la gráfica N° 36 se muestra la comparativa de estos datos.

Excipiente	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
Valsartán	0,3837	0,3836	0,0002	0,05	3,34
	0,3838				
	0,3834				
Crospovidona 0,32 mg/mL	0,0988	0,0991	0,0003	0,25	12,92
	0,0991				
	0,0993				
Estearato de Magnesio 0,072 mg/mL	0,4469	0,4464	0,0005	0,10	2,87
	0,4460				
	0,4464				
Celulosa Microcristalina 0,60 mg/mL	0,4602	0,4605	0,0003	0,07	2,78
	0,4608				
	0,4604				
Macrogol 0,006 mg/mL	0,1015	0,1019	0,0004	0,40	12,57
	0,1023				
	0,1018				

HidroxiMetilCelulosa 0,06 mg/mL	0,4542	0,4544	0,0007	0,15	2,82
	0,4552				
	0,4539				
Talco 0,006 mg/mL	0,3694	0,3696	0,0006	0,15	3,46
	0,3691				
	0,3702				
Oxido de Titanio 0,009 mg/mL	0,2487	0,2485	0,0002	0,08	5,15
	0,2483				
	0,2486				
Silicio 0,024 mg/mL	0,3072	0,3077	0,0005	0,16	4,16
	0,3076				
	0,3082				

Tabla 77: Concentración de saturación de valsartán en presencia de excipientes



Gráfica 36: Concentración de saturación de valsartán en presencia de excipientes

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	1,248	0,329	NS
ANOVA		<0,0001	S

Tabla 78: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a la concentración de saturación de valsartán en presencia de excipientes de las formulaciones en estudio

Prueba de Comparación Múltiple de Scheffe	
Con excipientes	Valsartán solo
Crospovidona	S
Estearato de Magnesio	S
Cel. Microcristalina	S
Macrogol	S
HMC	S
Talco	S
Oxido de Titanio	S
Silicio	S

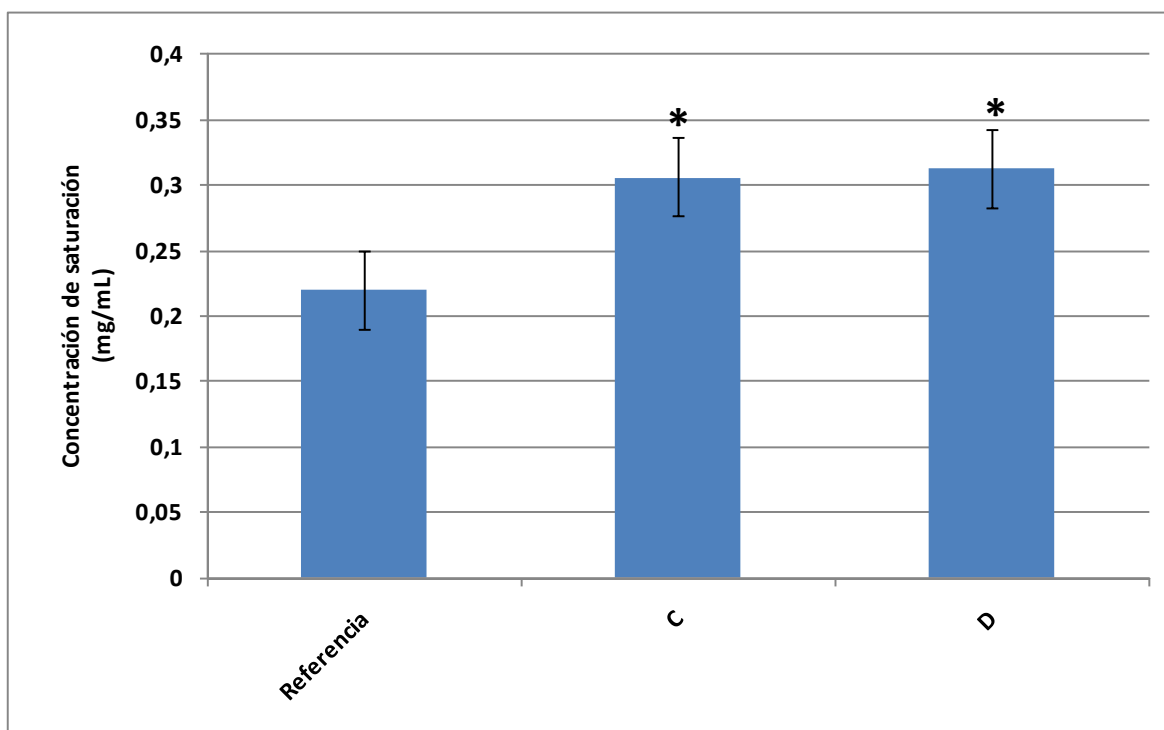
Tabla 79: Resultado de la comparación múltiple de Scheffe de la concentración de saturación de valsartán en presencia de excipientes de las formulaciones en estudio

2.2.4. Producto terminado

En la tabla N° 80 se muestran las concentraciones experimentales de valsartán en condiciones de saturación a partir del producto terminado de las formulaciones estudiadas en 24 horas, usando agua como medio de disolución. En la gráfica N° 37 se muestra la concentración de saturación de las formulaciones en estudio Valsartán.

Formulación	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
Referencia	0,2197	0,2203	0,0005	0,23	5,81
	0,2204				
	0,2207				
C	0,3067	0,3063	0,0003	0,10	4,18
	0,3061				
	0,3062				
D	0,3122	0,3127	0,0005	0,15	4,09
	0,3131				
	0,3129				

Tabla 80: Concentración de saturación de las formulaciones en estudio de valsartán



Gráfica 37: Concentración de saturación de las formulaciones en estudio de valsartán

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	0,475	0,643	NS
ANOVA		<0,0001	S

Tabla 81: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a la concentración de saturación de valsartán de las formulaciones en estudio (Referencia, C y D)

Prueba de Comparación Múltiple de Scheffe	
Formulación	Referencia
C	S
D	S

Tabla 82: Resultado de la comparación múltiple de Scheffe de la concentración de saturación de valsartán de las formulaciones en estudio (Referencia, C y D)

2.3. Ensayo de disgregación

En la tabla N° 83, se muestran los resultados de los tiempos de disgregación en agua del producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán según lo establecido en la EP.

Formulación	Tiempo de disgregación individual (min)						Promedio (min)	DE	CV %
	1	2	3	4	5	6			
Referencia	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9	1,0	0,8	0,1	15,0
C	0,4	0,4	0,5	0,6	0,8	0,9	0,6	0,2	35,2
D	0,3	0,3	0,5	0,6	0,8	0,8	0,6	0,2	37,5

Tabla 83: Tiempo de disgregación de las formulaciones en estudio de valsartán

2.4. Perfiles de disolución de las formulaciones de valsartán

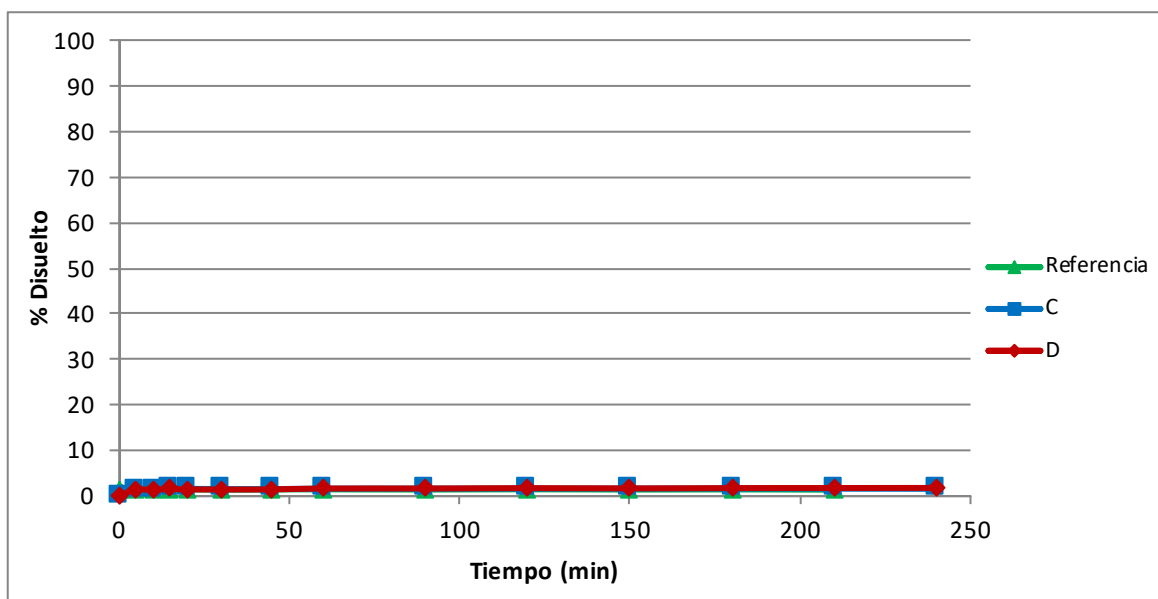
2.4.1. Aparato de disolución II, paletas

En las tablas N° 84, 85 y 86 se resumen los valores de medios de porcentaje disuelto de valsartán en función del tiempo de producto de referencia y las formulaciones C y D en los

medios recomendados por la guía de bioexenciones de la EMA. Las representaciones gráficas de estos perfiles se pueden observar en las gráficas de la 39 a la 41.

pH 1,2 (tampón cloruro 50 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	1,14 \pm 0,08	7,14	1,35 \pm 0,19	14,22	1,30 \pm 0,08	6,17
10	1,34 \pm 0,04	3,22	1,32 \pm 0,12	9,16	1,33 \pm 0,09	6,85
15	1,29 \pm 0,08	6,11	1,51 \pm 0,09	6,00	1,45 \pm 0,09	5,98
20	1,35 \pm 0,08	6,15	1,52 \pm 0,08	5,46	1,40 \pm 0,04	3,16
30	1,38 \pm 0,07	4,92	1,47 \pm 0,06	4,03	1,38 \pm 0,10	7,00
45	1,32 \pm 0,03	2,41	1,45 \pm 0,03	1,93	1,39 \pm 0,05	3,65
60	1,36 \pm 0,09	6,63	1,56 \pm 0,05	3,18	1,59 \pm 0,07	4,41
90	1,40 \pm 0,04	2,72	1,57 \pm 0,05	3,37	1,59 \pm 0,08	4,90
120	1,35 \pm 0,08	5,90	1,57 \pm 0,08	5,37	1,67 \pm 0,07	4,35
150	1,41 \pm 0,04	2,53	1,58 \pm 0,08	4,88	1,62 \pm 0,09	5,68
180	1,35 \pm 0,03	2,24	1,59 \pm 0,06	3,77	1,68 \pm 0,04	2,24
210	1,38 \pm 0,06	4,35	1,55 \pm 0,05	3,02	1,70 \pm 0,06	3,35
240	1,32 \pm 0,04	2,71	1,52 \pm 0,02	1,41	1,72 \pm 0,03	1,69

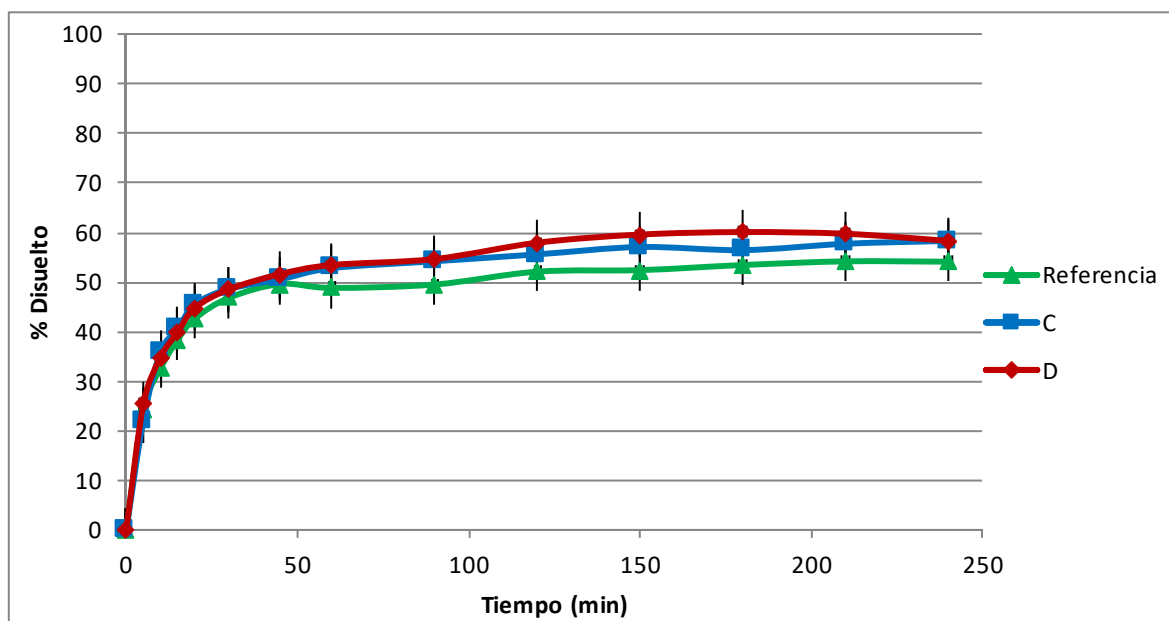
Tabla 84: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio tampón pH 1,2 de cloruro de sodio 50 mM empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 38: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio tampón pH 1,2 de cloruro de sodio 50 mM (n=6)

pH 4,5 (tampón acetato 36,5 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	24,52 \pm 0,52	2,13	22,14 \pm 1,46	6,57	25,45 \pm 1,59	6,26
10	32,65 \pm 0,49	1,49	35,98 \pm 4,33	12,03	34,89 \pm 4,32	12,38
15	38,42 \pm 1,15	3,00	40,59 \pm 3,01	7,42	39,97 \pm 3,86	9,65
20	42,68 \pm 1,24	2,91	45,54 \pm 2,30	5,04	44,82 \pm 2,84	6,33
30	46,88 \pm 1,13	2,40	48,65 \pm 3,51	7,21	48,58 \pm 1,49	3,07
45	49,65 \pm 0,74	1,49	50,61 \pm 2,10	4,15	51,65 \pm 1,36	2,62
60	48,87 \pm 2,42	4,96	52,85 \pm 1,14	2,16	53,48 \pm 1,44	2,69
90	49,55 \pm 1,20	2,42	54,24 \pm 1,48	2,73	54,69 \pm 2,83	5,17
120	52,14 \pm 2,35	4,51	55,63 \pm 0,68	1,22	57,98 \pm 1,47	2,53
150	52,45 \pm 0,75	1,42	57,11 \pm 1,01	1,76	59,62 \pm 1,18	1,97
180	53,48 \pm 2,24	4,19	56,48 \pm 1,47	2,61	60,12 \pm 1,17	1,95
210	54,22 \pm 0,65	1,21	57,77 \pm 2,31	4,00	59,78 \pm 0,74	1,25
240	54,15 \pm 1,30	2,40	58,34 \pm 1,02	1,75	58,35 \pm 2,59	4,44

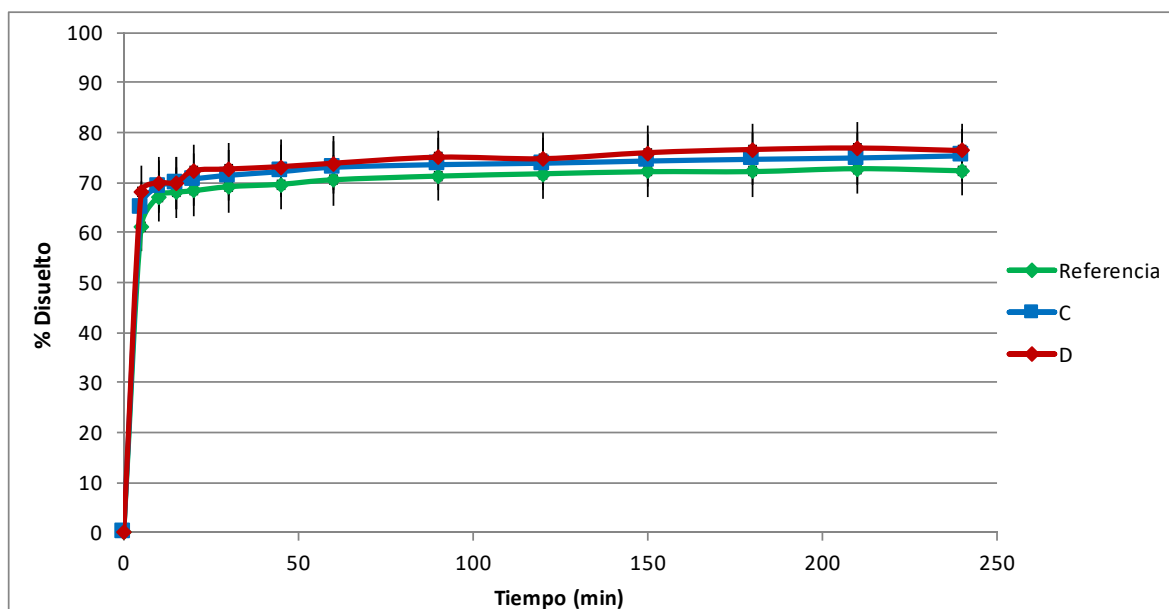
Tabla 85: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio tampón pH 4,5 de acetato de sodio 36,5 mM empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 39: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán a pH 4,5 en medio tampón pH 4,5 de acetato de sodio 36,5 mM (n=6)

pH 6,8 (tampón fosfato 50 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	61,22 \pm 0,67	1,09	65,15 \pm 2,70	4,15	68,03 \pm 4,58	6,73
10	67,18 \pm 1,15	1,72	69,22 \pm 4,23	6,11	69,88 \pm 4,54	6,50
15	68,02 \pm 1,31	1,92	69,84 \pm 3,70	5,30	69,97 \pm 3,27	4,67
20	68,34 \pm 2,58	3,78	70,67 \pm 0,83	1,17	72,36 \pm 1,41	1,95
30	69,15 \pm 2,11	3,06	71,42 \pm 3,30	4,62	72,69 \pm 1,04	1,43
45	69,63 \pm 1,71	2,45	72,16 \pm 0,81	1,12	73,15 \pm 2,49	3,41
60	70,53 \pm 1,44	2,04	73,03 \pm 2,15	2,95	73,84 \pm 3,17	4,29
90	71,27 \pm 1,54	2,16	73,55 \pm 3,40	4,63	75,05 \pm 1,27	1,69
120	71,73 \pm 2,57	3,58	73,84 \pm 2,17	2,94	74,75 \pm 2,28	3,05
150	72,15 \pm 1,26	1,75	74,28 \pm 2,34	3,16	75,95 \pm 1,87	2,46
180	72,16 \pm 1,67	2,32	74,62 \pm 1,60	2,15	76,59 \pm 3,72	4,86
210	72,75 \pm 1,83	2,52	74,89 \pm 1,64	2,19	76,88 \pm 2,44	3,18
240	72,33 \pm 1,64	2,26	75,32 \pm 0,86	1,14	76,37 \pm 1,13	1,48

Tabla 86: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 50 mM, empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)

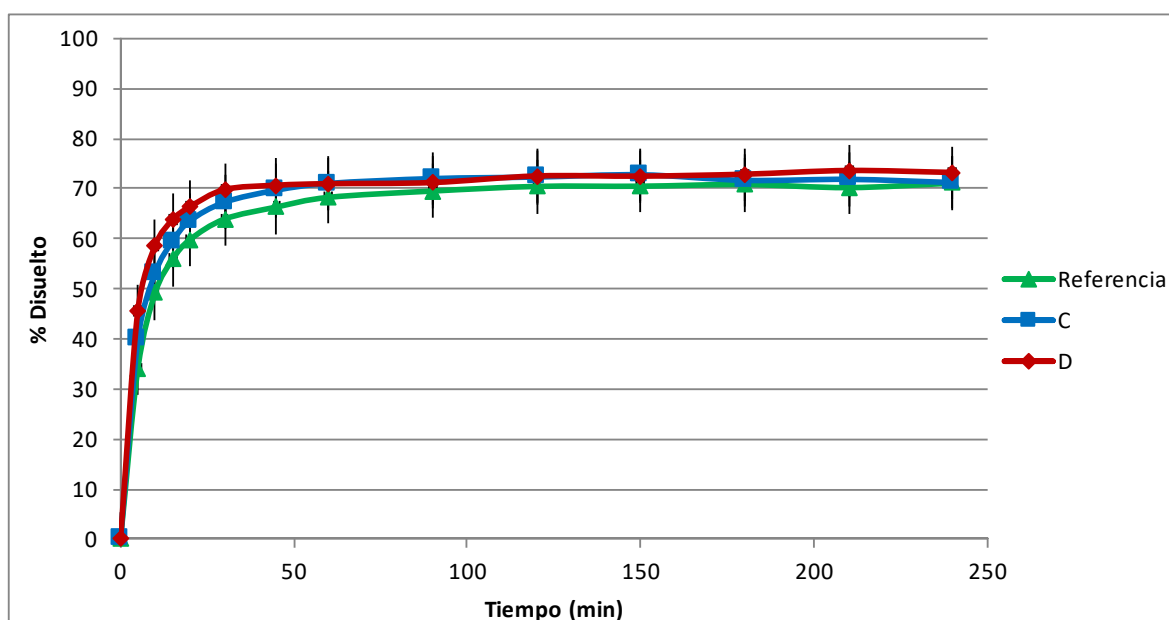


Gráfica 40: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 50 mM (n=6)

Los valores medios de porcentaje disuelto de valsartán en función del tiempo del producto de referencia y las formulaciones C y D en el medio pH 6,8 de menor concentración iónica que la establecida en la EP se muestran en la tabla N° 87 y la representación gráfica de este perfil se pueden observar en la gráfica N° 41.

pH 6,8 (tampón fosfato 10 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	34,09 \pm 0,57	1,66	39,91 \pm 3,14	7,88	45,67 \pm 3,18	6,97
10	49,23 \pm 1,16	2,36	53,19 \pm 3,55	6,68	58,69 \pm 3,52	6,00
15	55,88 \pm 1,55	2,77	59,50 \pm 1,47	2,47	63,78 \pm 2,71	4,24
20	59,82 \pm 0,73	1,22	63,57 \pm 2,07	3,25	66,38 \pm 3,62	5,46
30	63,94 \pm 1,17	1,84	67,30 \pm 2,16	3,21	69,83 \pm 2,46	3,52
45	66,34 \pm 2,48	3,74	69,71 \pm 0,97	1,39	70,70 \pm 1,41	2,00
60	68,27 \pm 2,07	3,03	71,06 \pm 1,81	2,55	71,01 \pm 2,49	3,51
90	69,54 \pm 1,41	2,02	72,02 \pm 3,37	4,67	71,24 \pm 1,37	1,92
120	70,46 \pm 2,23	3,17	72,33 \pm 1,58	2,18	72,55 \pm 4,00	5,51
150	70,50 \pm 0,70	1,00	72,78 \pm 0,92	1,26	72,51 \pm 2,45	3,37
180	70,84 \pm 0,90	1,27	71,67 \pm 1,64	2,29	72,90 \pm 1,22	1,68
210	70,22 \pm 1,11	1,58	71,87 \pm 2,31	3,22	73,64 \pm 2,06	2,80
240	71,11 \pm 0,78	1,10	71,23 \pm 4,15	5,83	73,25 \pm 2,29	3,12

Tabla 87: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 10 mM empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)

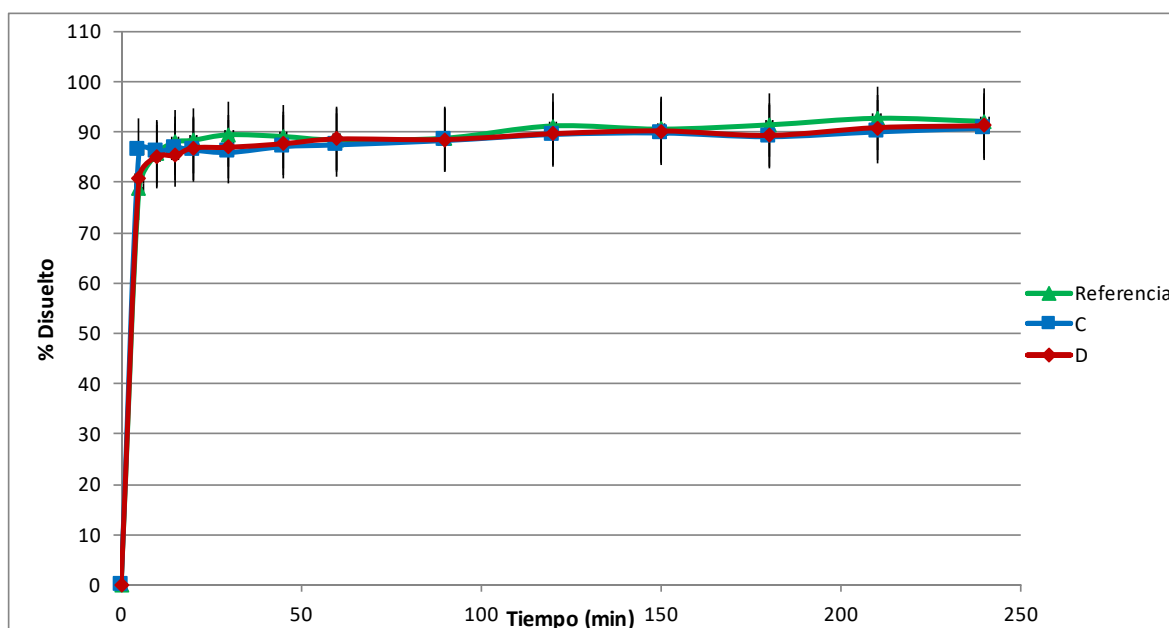


Gráfica 41: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 10 mM (n=6)

En las tablas de la 88 a la 93 se presentan los valores de medios de porcentaje disuelto de valsartán en función del tiempo del producto de referencia y las formulaciones C y D en los medios a pH 6,5 combinados con LSS 0,1 y 1%.; Tween 20 con 0,30; 0,20; 0,15; 0,10%. Las gráficas de la 42 a la 47 se los perfiles de disolución correspondientes a los medios antes mencionados.

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con LSS 0,1%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	78,93 \pm 3,05	3,87	86,39 \pm 4,44	5,14	80,93 \pm 4,13	5,11
10	85,67 \pm 3,77	4,40	85,99 \pm 5,50	6,39	85,17 \pm 5,21	6,12
15	87,99 \pm 3,01	3,43	86,89 \pm 5,29	6,09	85,34 \pm 3,25	3,80
20	88,37 \pm 2,76	3,12	86,43 \pm 6,67	7,72	86,86 \pm 5,63	6,49
30	89,46 \pm 5,07	5,67	85,94 \pm 2,32	2,69	86,98 \pm 4,48	5,15
45	89,11 \pm 3,40	3,82	87,10 \pm 3,37	3,86	87,67 \pm 6,59	7,51
60	88,42 \pm 2,54	2,87	87,45 \pm 1,86	2,13	88,62 \pm 6,18	6,98
90	88,78 \pm 1,46	1,64	88,31 \pm 4,70	5,32	88,52 \pm 5,30	5,99
120	91,22 \pm 2,64	2,90	89,52 \pm 5,33	5,95	89,68 \pm 3,43	3,83
150	90,58 \pm 4,24	4,68	89,81 \pm 7,13	7,94	90,23 \pm 1,72	1,90
180	91,42 \pm 2,37	2,59	89,07 \pm 3,50	3,93	89,34 \pm 2,49	2,79
210	92,73 \pm 3,53	3,81	90,03 \pm 2,17	2,41	90,88 \pm 2,59	2,85
240	92,11 \pm 1,14	1,23	90,77 \pm 4,60	5,07	91,25 \pm 2,28	2,50

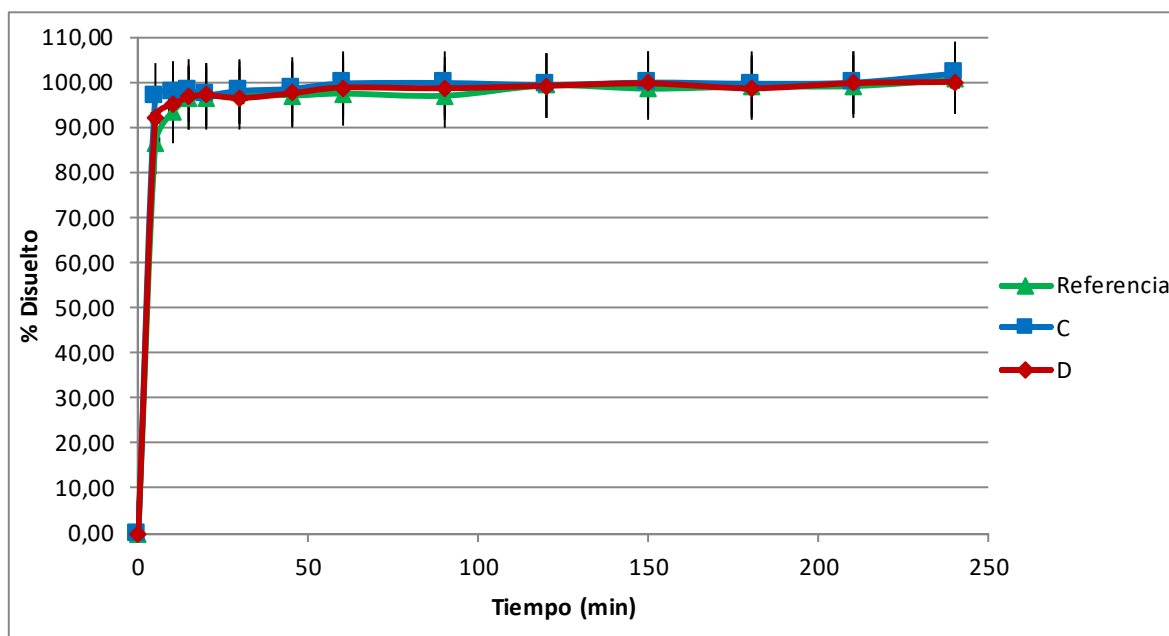
Tabla 88: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 0,1% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 42: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 0,1% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con LSS 1%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	86,29 \pm 2,66	3,08	97,01 \pm 5,94	6,13	92,03 \pm 6,01	6,53
10	93,32 \pm 2,08	2,23	97,55 \pm 5,21	5,34	95,02 \pm 6,92	7,28
15	96,31 \pm 2,48	2,57	98,08 \pm 4,77	4,86	96,66 \pm 5,27	5,46
20	96,54 \pm 3,58	3,71	97,12 \pm 2,56	2,64	97,14 \pm 5,30	5,45
30	97,79 \pm 1,51	1,54	98,05 \pm 3,15	3,21	96,49 \pm 2,56	2,65
45	97,05 \pm 1,15	1,18	98,50 \pm 4,25	4,32	97,51 \pm 2,16	2,21
60	97,47 \pm 4,70	4,82	99,68 \pm 5,49	5,51	98,79 \pm 3,14	3,17
90	96,98 \pm 3,53	3,64	99,80 \pm 6,71	6,72	98,63 \pm 4,40	4,46
120	99,26 \pm 3,62	3,65	99,37 \pm 3,64	3,67	99,19 \pm 2,61	2,63
150	98,55 \pm 2,87	2,91	99,90 \pm 2,37	2,37	99,71 \pm 1,20	1,21
180	99,04 \pm 2,53	2,55	99,65 \pm 5,80	5,83	98,62 \pm 1,43	1,45
210	99,12 \pm 1,48	1,49	99,88 \pm 2,79	2,80	99,77 \pm 1,55	1,55
240	100,56 \pm 1,83	1,82	101,88 \pm 1,50	1,47	100,05 \pm 1,85	1,85

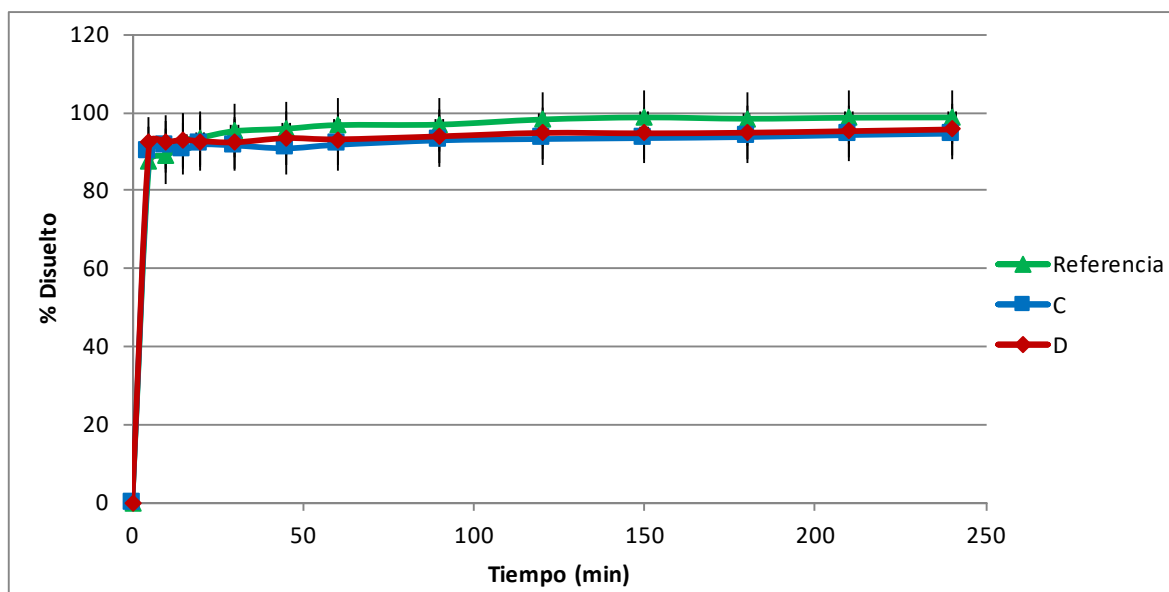
Tabla 89: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 1% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 43: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 1% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,30%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	87,45 \pm 1,56	1,79	89,86 \pm 5,44	6,05	92,34 \pm 8,65	9,37
10	88,76 \pm 2,34	2,63	91,24 \pm 2,36	2,58	92,44 \pm 5,72	6,19
15	92,66 \pm 3,58	3,86	90,49 \pm 1,78	1,97	92,98 \pm 4,58	4,92
20	93,55 \pm 2,19	2,34	91,79 \pm 1,66	1,81	92,67 \pm 4,45	4,80
30	95,22 \pm 2,81	2,95	91,55 \pm 1,00	1,09	92,35 \pm 1,80	1,94
45	95,84 \pm 1,53	1,60	90,81 \pm 1,36	1,49	93,43 \pm 1,62	1,73
60	96,77 \pm 1,21	1,25	91,72 \pm 1,35	1,48	93,12 \pm 2,03	2,18
90	96,90 \pm 2,63	2,71	92,86 \pm 4,15	4,47	93,88 \pm 4,65	4,95
120	98,21 \pm 1,27	1,29	93,2 \pm 5,49	5,89	94,77 \pm 3,63	3,83
150	98,74 \pm 3,37	3,41	93,44 \pm 3,71	3,97	94,66 \pm 3,08	3,26
180	98,40 \pm 6,26	6,36	93,71 \pm 2,20	2,35	94,82 \pm 2,62	2,76
210	98,66 \pm 2,91	2,95	94,22 \pm 2,70	2,87	95,22 \pm 1,53	1,61
240	98,74 \pm 2,22	2,24	94,58 \pm 2,68	2,84	95,66 \pm 3,03	3,17

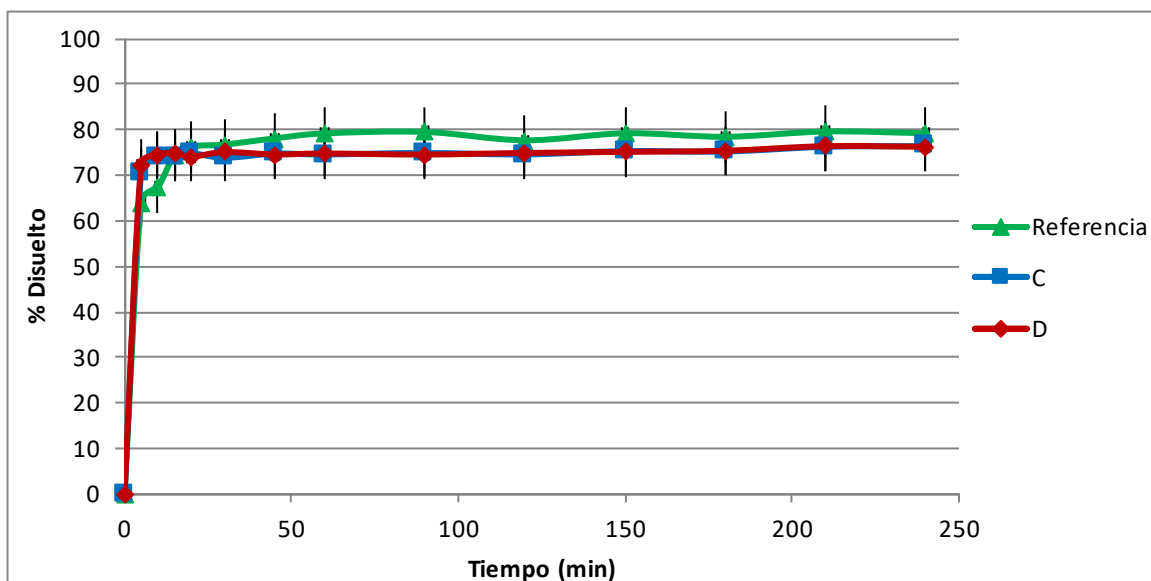
Tabla 90: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,30% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 44: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,30% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,20%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	64,07 \pm 4,86	7,59	70,57 \pm 5,48	7,77	72,37 \pm 6,65	9,19
10	67,33 \pm 4,09	6,07	73,87 \pm 5,44	7,36	74,48 \pm 5,72	7,68
15	74,47 \pm 3,11	4,18	73,93 \pm 2,36	3,19	74,92 \pm 4,58	6,11
20	76,30 \pm 1,77	2,32	74,81 \pm 1,78	2,38	74,07 \pm 4,45	6,01
30	76,73 \pm 2,30	3,00	73,82 \pm 1,66	2,25	75,08 \pm 1,80	2,39
45	78,08 \pm 1,57	2,01	74,73 \pm 1,00	1,33	74,57 \pm 1,62	2,17
60	79,18 \pm 1,85	2,34	74,56 \pm 1,36	1,82	74,76 \pm 2,03	2,72
90	79,49 \pm 1,96	2,46	74,88 \pm 1,35	1,81	74,54 \pm 5,34	7,16
120	77,66 \pm 2,85	3,67	74,56 \pm 1,53	2,05	74,89 \pm 6,67	8,91
150	79,20 \pm 1,73	2,19	75,29 \pm 3,03	4,03	75,12 \pm 6,36	8,47
180	78,44 \pm 3,25	4,14	75,20 \pm 1,56	2,08	75,37 \pm 5,04	6,69
210	79,59 \pm 1,15	1,44	76,24 \pm 1,76	2,31	76,37 \pm 4,17	5,47
240	79,22 \pm 3,69	4,66	76,39 \pm 2,46	3,22	76,24 \pm 3,05	4,00

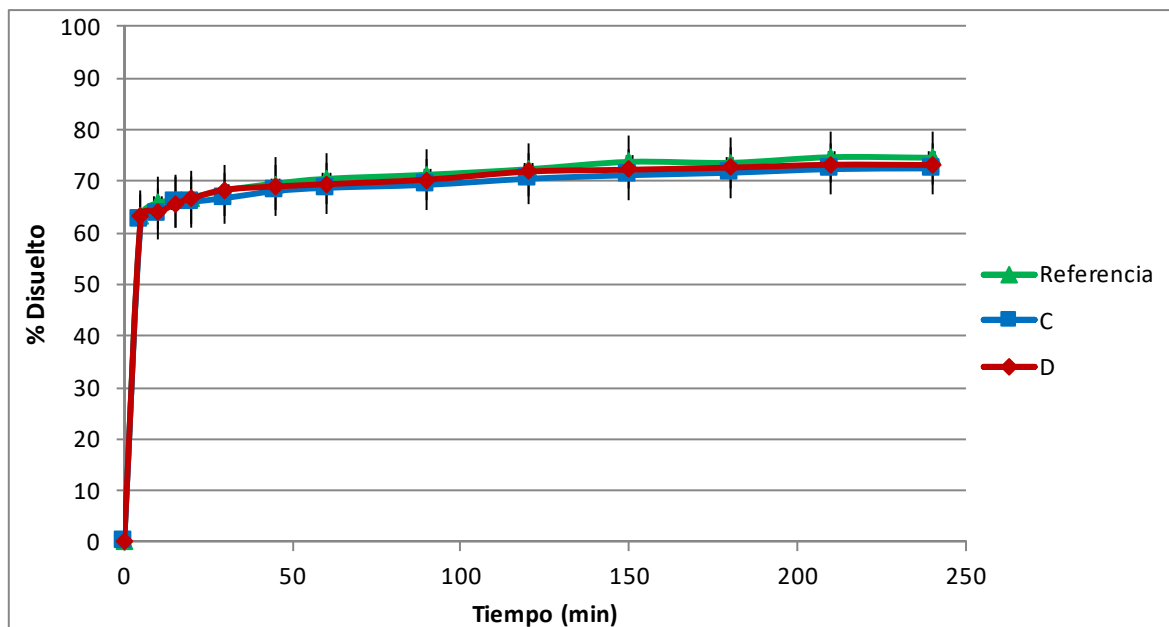
Tabla 91: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de osfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,20% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 45: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio tampón pH 6,5 de osfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,20% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,15%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	63,12 \pm 5,6	8,8	62,45 \pm 5,1	8,2	63,44 \pm 5,9	9,19
10	65,78 \pm 4,2	6,4	63,79 \pm 5,4	8,4	63,91 \pm 5,8	7,68
15	66,23 \pm 1,9	2,8	65,89 \pm 5,8	8,9	65,59 \pm 4,3	6,11
20	66,88 \pm 1,4	2,1	66,03 \pm 3,8	5,8	66,69 \pm 2,5	6,01
30	68,26 \pm 1,0	1,4	66,76 \pm 3,0	4,5	68,38 \pm 1,5	2,39
45	69,56 \pm 4,4	6,4	68,11 \pm 3,6	5,3	68,99 \pm 3,1	2,17
60	70,48 \pm 5,3	7,6	68,73 \pm 2,1	3,1	69,44 \pm 1,3	2,72
90	71,27 \pm 4,4	6,2	69,32 \pm 2,2	3,2	70,32 \pm 2,0	7,16
120	72,34 \pm 5,4	7,5	70,49 \pm 1,4	2,0	71,88 \pm 4,8	8,91
150	73,77 \pm 2,1	2,8	71,18 \pm 4,6	6,5	72,25 \pm 1,5	8,47
180	73,59 \pm 2,5	3,5	71,66 \pm 3,6	5,1	72,66 \pm 3,5	6,69
210	74,68 \pm 3,7	5,0	72,36 \pm 3,1	4,3	73,22 \pm 3,5	5,47
240	74,57 \pm 1,8	2,4	72,50 \pm 2,6	3,6	73,17 \pm 3,4	4,00

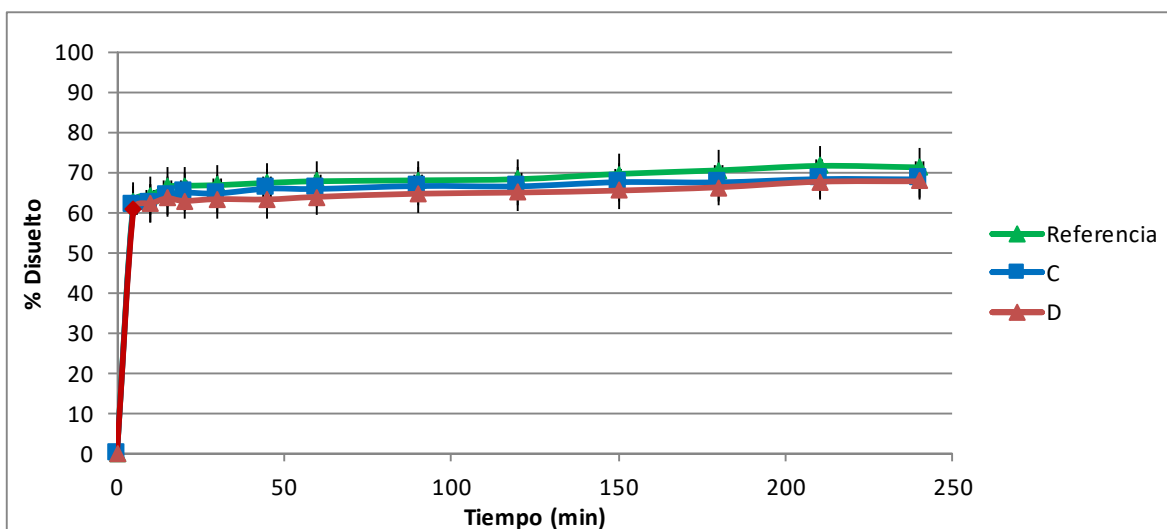
Tabla 92: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,15% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 46: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,15% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,10%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	62,61 \pm 3,92	6,27	61,97 \pm 4,22	6,81	60,99 \pm 4,85	7,95
10	64,23 \pm 0,88	1,37	62,46 \pm 3,74	5,99	62,24 \pm 4,09	6,57
15	66,41 \pm 1,80	2,71	64,03 \pm 3,01	4,71	63,60 \pm 2,82	4,44
20	66,71 \pm 1,94	2,92	64,99 \pm 2,60	4,00	62,95 \pm 3,59	5,70
30	66,86 \pm 2,19	3,27	64,79 \pm 1,96	3,02	63,39 \pm 1,26	1,99
45	67,43 \pm 2,20	3,26	65,99 \pm 1,55	2,35	63,31 \pm 4,61	7,28
60	67,83 \pm 2,32	3,41	65,92 \pm 1,42	2,16	63,95 \pm 4,14	6,47
90	68,06 \pm 1,58	2,32	66,65 \pm 3,25	4,88	64,74 \pm 3,32	5,13
120	68,35 \pm 2,45	3,59	66,57 \pm 1,07	1,60	65,03 \pm 3,65	5,61
150	69,66 \pm 1,48	2,13	67,60 \pm 1,13	1,68	65,52 \pm 2,40	3,66
180	70,54 \pm 1,99	2,83	67,55 \pm 1,41	2,08	66,34 \pm 2,50	3,77
210	71,65 \pm 2,44	3,40	68,36 \pm 1,41	2,06	67,72 \pm 1,48	2,18
240	71,28 \pm 1,32	1,85	68,29 \pm 1,72	2,52	67,82 \pm 1,10	1,62

Tabla 93: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,10% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)

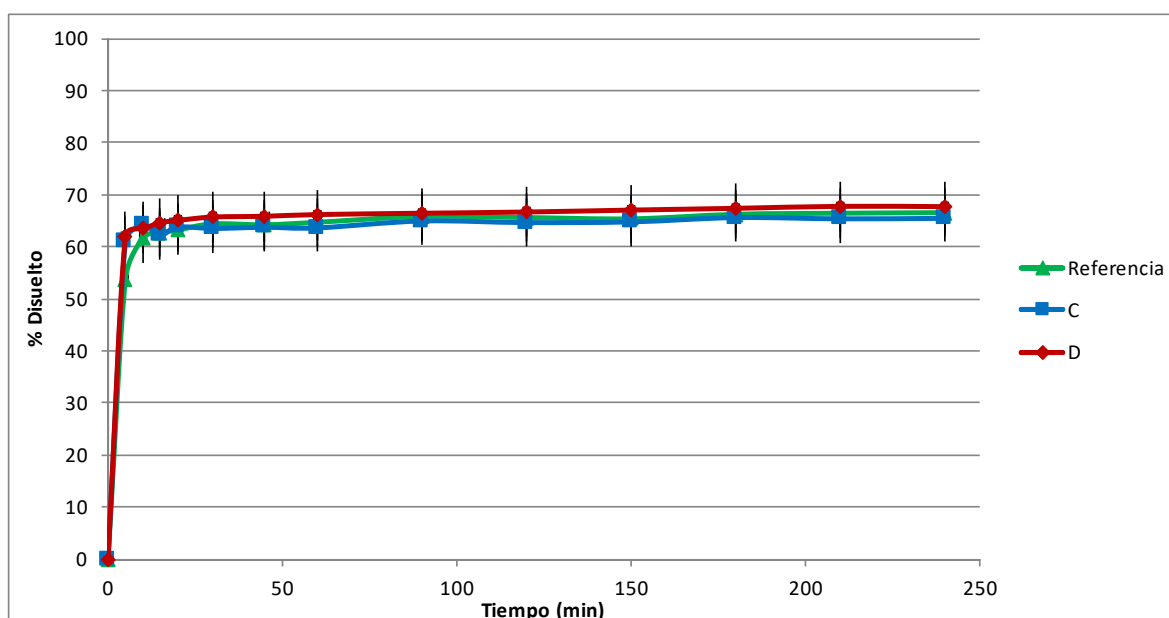


Gráfica 47: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,10% (n=6)

En la tabla N° 94 se presenta los valores de medios de porcentaje disuelto de valsartán en función del tiempo del producto de referencia y las formulaciones C y D en medio FaSSIF. La gráfica N° 48 se muestra los perfiles de disolución comparativos en el medio antes mencionado.

FaSSIF. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	53,82 \pm 2,82	5,23	61,07 \pm 4,16	6,81	62,12 \pm 4,32	6,95
10	61,63 \pm 2,21	3,58	64,23 \pm 4,99	7,77	63,46 \pm 4,32	6,81
15	62,70 \pm 1,76	2,81	62,26 \pm 2,56	4,12	64,61 \pm 3,82	5,92
20	63,23 \pm 1,55	2,46	63,80 \pm 3,33	5,22	65,07 \pm 4,76	7,31
30	64,41 \pm 2,58	4,01	63,53 \pm 2,94	4,63	65,71 \pm 3,40	5,17
45	64,24 \pm 2,16	3,37	63,75 \pm 2,68	4,20	65,87 \pm 3,34	5,07
60	64,71 \pm 1,54	2,39	63,63 \pm 1,06	1,67	66,20 \pm 1,58	2,39
90	65,83 \pm 1,71	2,60	64,96 \pm 4,85	7,47	66,45 \pm 2,28	3,43
120	65,62 \pm 2,39	3,64	64,66 \pm 1,03	1,59	66,69 \pm 1,71	2,56
150	65,38 \pm 0,90	1,37	64,79 \pm 1,06	1,64	67,06 \pm 2,58	3,85
180	66,25 \pm 1,01	1,52	65,61 \pm 4,53	6,91	67,40 \pm 2,69	3,99
210	66,46 \pm 1,52	2,29	65,38 \pm 2,15	3,29	67,78 \pm 1,38	2,04
240	66,56 \pm 1,97	2,97	65,47 \pm 1,11	1,70	67,72 \pm 1,36	2,00

Tabla 94: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio FaSSIF empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 48: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio FaSSIF (n=6)

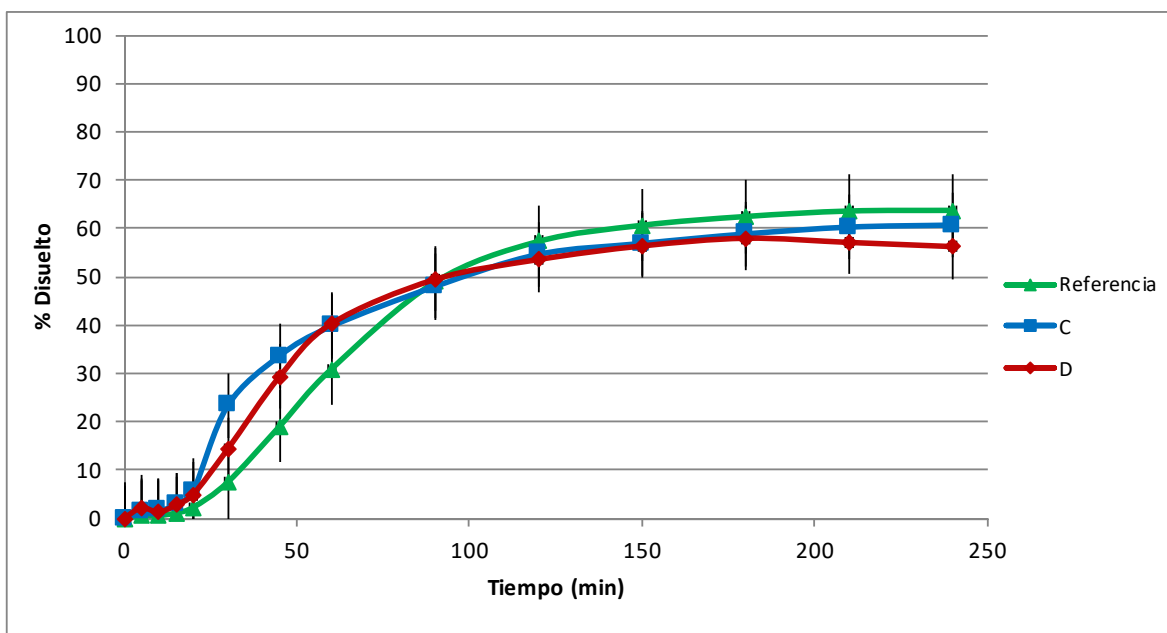
2.4.2. **Aparato de disolución IV, celda de flujo**

En la tabla N° 95 se presentan los valores de medios de porcentaje disuelto de valsartán en función del tiempo de producto de referencia y las formulaciones C y D en los medios de disolución pH 1,2; 4,5 y 6,8 todos con Tween 20 0,20%. El cambio de pH 1,2 a pH 4,5 se realizó en el minuto 15 del ensayo y el cambio de pH 4,5 a pH 6,8 se realizó en el minuto 30 del ensayo. En la tabla N° 96 se muestran los resultados de porcentaje disuelto de valsartán de las mismas formulaciones en medios de disolución FaSSGF y FaSSIF. El cambio de medio se realizó en el minuto 15 del ensayo.

Las gráficas N° 49 y 50 corresponden a los perfiles en los medios antes señalados.

pH 1,2 50 mM + pH 4,5 36,5 mM + pH 6,8 50 mM todos con Tween 20 0.20 %.						
Aparato IV. 8 mL/min						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	0,51 \pm 0,01	1,79	1,48 \pm 0,10	6,52	2,15 \pm 0,09	4,06
10	0,56 \pm 0,01	2,59	1,57 \pm 0,08	5,25	1,28 \pm 0,09	6,99
15	1,09 \pm 0,03	2,41	2,73 \pm 0,07	2,69	2,74 \pm 0,07	2,45
20	2,25 \pm 0,05	2,24	5,60 \pm 0,42	7,47	4,94 \pm 0,17	3,37
30	7,45 \pm 0,13	1,80	23,29 \pm 1,73	7,43	14,28 \pm 1,36	9,54
45	18,99 \pm 0,57	2,98	33,58 \pm 1,09	3,25	29,28 \pm 1,73	5,91
60	30,83 \pm 1,04	3,38	39,72 \pm 2,08	5,24	40,24 \pm 1,63	4,05
90	48,86 \pm 0,91	1,86	47,94 \pm 2,07	4,31	49,41 \pm 1,81	3,66
120	57,28 \pm 0,44	0,77	54,60 \pm 3,02	5,53	53,53 \pm 2,21	4,12
150	60,62 \pm 0,18	0,30	56,86 \pm 1,07	1,88	56,35 \pm 0,77	1,36
180	62,44 \pm 0,19	0,31	58,83 \pm 2,06	3,51	57,94 \pm 1,49	2,57
210	63,58 \pm 0,14	0,22	60,25 \pm 5,03	8,35	57,08 \pm 0,96	1,69
240	63,71 \pm 0,22	0,34	60,67 \pm 1,07	1,76	56,21 \pm 2,27	4,04

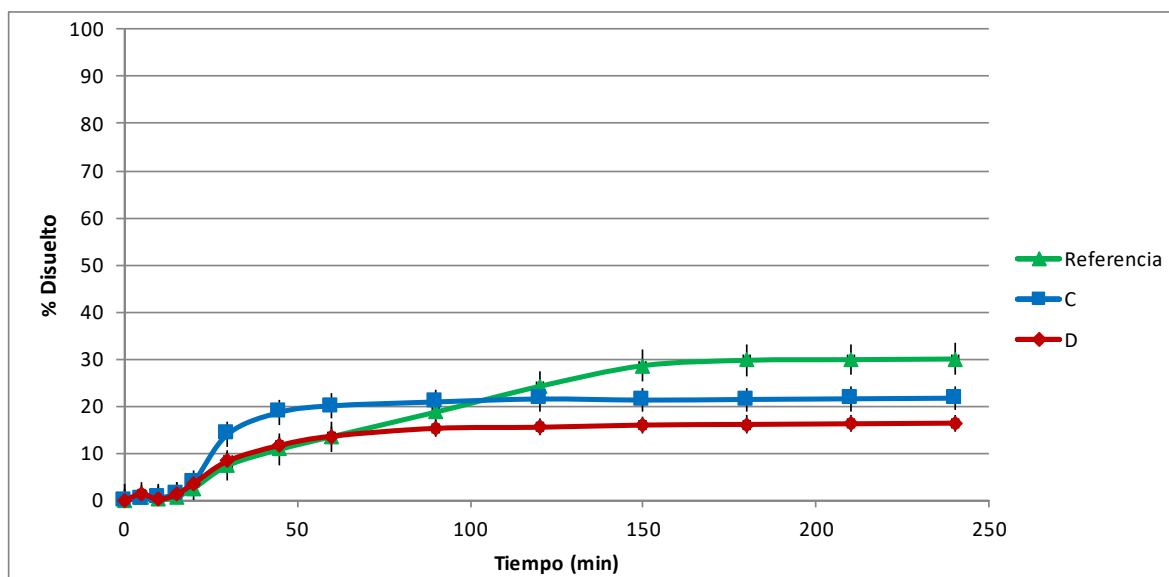
Tabla 95: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en medio pH 1,2 50 mM + pH 4,5 36,5 mM + pH 6,8 50 mM todos con Tween 20 0,20 %, empleando aparato IV a 8 mL/min (n=6)



Gráfica 49: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio pH 1,2 50 mM + pH 4,5 36,5 mM + pH 6,8 50 mM todos con Tween 20 0,20 % (n=6)

FaSSGF+FaSSIF. Aparato IV. 8 mL/min						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		C		D	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	0,65 \pm 0,01	2,09	0,38 \pm 0,02	6,25	1,27 \pm 0,07	5,64
10	0,12 \pm 0,01	2,97	0,49 \pm 0,04	7,55	0,19 \pm 0,01	4,40
15	0,68 \pm 0,03	4,87	1,38 \pm 0,06	4,64	1,23 \pm 0,06	5,13
20	2,47 \pm 0,03	1,03	3,73 \pm 0,19	5,23	3,52 \pm 0,34	9,67
30	7,39 \pm 0,13	1,73	14,08 \pm 0,35	2,51	8,37 \pm 0,71	8,50
45	10,81 \pm 0,57	5,31	18,68 \pm 0,94	5,01	11,67 \pm 0,29	2,52
60	13,51 \pm 0,41	3,07	20,06 \pm 0,41	2,07	13,60 \pm 0,43	3,19
90	18,71 \pm 1,13	6,02	20,88 \pm 0,66	3,17	15,27 \pm 0,36	2,35
120	24,18 \pm 0,25	1,04	21,51 \pm 1,15	5,34	15,51 \pm 0,99	6,40
150	28,59 \pm 1,03	3,60	21,27 \pm 1,06	4,98	15,97 \pm 1,03	6,44
180	29,73 \pm 1,15	3,86	21,41 \pm 1,26	5,89	16,11 \pm 0,53	3,28
210	29,86 \pm 1,04	3,49	21,55 \pm 0,50	2,34	16,24 \pm 0,91	5,61
240	30,00 \pm 0,31	1,02	21,68 \pm 1,13	5,23	16,38 \pm 0,51	3,14

Tabla 96: Porcentajes disueltos de valsartán en función del tiempo en FaSSGF+FaSSIF, empleando aparato IV a 8 mL/min (n=6)



Gráfica 50: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones C y D de valsartán en medio FaSSGF+FaSSIF (n=6)

2.5. Comparación de las cinéticas de disolución con factor de similitud f_2 para las formulaciones de valsartán

2.5.1. Factor de similitud f_2 . Aparato II. 50 r.p.m.

En la tabla N° 97 se presentan los factores de similitud f_2 entre el producto referencia de valsartán y las formulaciones C y D en los medios estudiados en el aparato II a 50 r.p.m.

Medios	C	D
pH 1,2 50 mM	99,7	99,5
pH 4,5 36,5 mM	91,7	84,4
pH 6,8 50 mM	92,5	54,3
pH 6,8 10 mM	94,1	66,1
LSS 0,1%	N/A	N/A
LSS 1%	N/A	N/A
Tween 20 0,10%	58,1	53,1
Tween 20 0,15%	53,8	61,1
Tween 20 0,20%	42,9	54,7
Tween 20 0,30%	N/A	N/A
FaSSIF	59,6	68,6

Tabla 97: Factor de similitud f_2 entre el producto de referencia y las formulaciones en estudio C y D de valsartán en aparato II a 50 r.p.m. (N/A: no aplica)

2.5.2. Factor de similitud f_2 . Aparato IV. 8 mL/min

En la tabla N° 98 se muestran los factores de similitud f_2 entre el producto referencia de valsartán y las formulaciones C y D en los medios estudiados en el aparato IV a 8 mL/min

f_2	C	D
pH 1.2 50 mM + pH 4.5 36.5 mM + pH 6.8 50 mM todos con Tween 20 0.20 %.	68,9	75,7
FaSSGF+FaSSIF	90,5	86,7

Tabla 98: Factor de similitud f_2 entre el producto de referencia y las formulaciones en estudio C y D de Valsartán en aparato IV a 8 mL/min

2.6. Ensayos *in situ* para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de valsartán

A continuación se presentan los resultados de los experimentos realizados en el modelo *in situ* con soluciones preparadas a partir de las tres formulaciones de valsartán (tablas de la 99 a la 101). En la gráfica N° 52 se representa la comparativa de las constantes de absorción de las formulaciones en estudio de valsartán (Referencia, C y D). Se puede observar la comparación de la constante de absorción de valsartán, solución preparada con el patrón, (tabla 104) con las constantes de absorción del mismo fármaco a partir de las formulaciones de Referencia, C y D en la gráfica N° 52.

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 160 µg/mL (Referencia) Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	77,44	91,85	120,35	81,09	92,68	19,43
10	73,74	85,01	111,93	76,45	86,78	17,44
15	68,27	83,61	108,75	74,57	83,80	17,78
20	62,55	81,82	100,29	72,25	79,23	16,10
25	56,64	77,81	90,60	66,51	72,89	14,64
30	54,55	74,19	81,68	57,35	66,94	13,11
Vr(mL)	5	6,5	5	5	5,38	0,75
Ajuste no lineal						
Ka(h ⁻¹)	0,90	0,47	0,88	0,71	0,74	0,20
A ₀ (µg/mL)	84,45	94,17	131,17	87,34	99,28	21,65

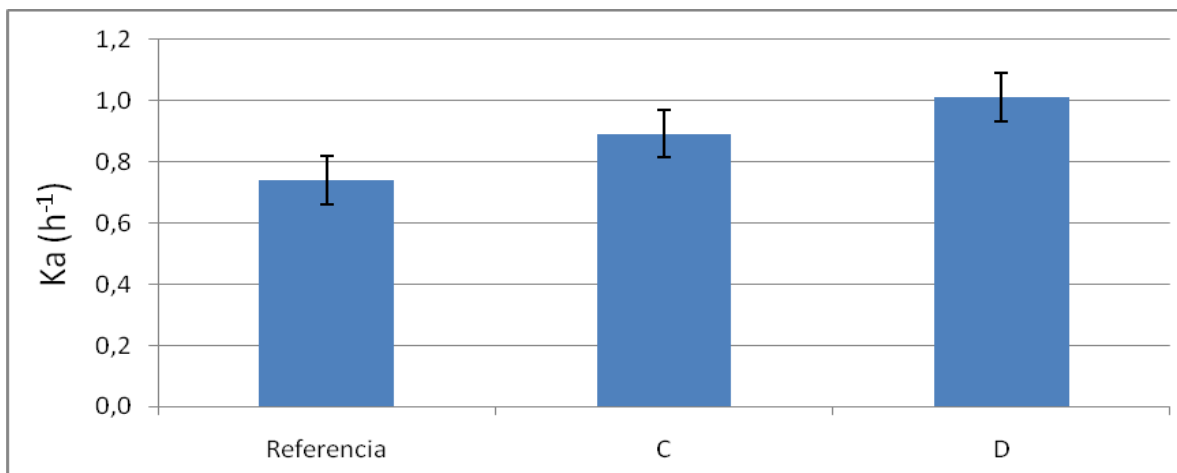
Tabla 99: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL preparada a partir del producto de Referencia

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 160 µg/mL (C) Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	111,87	92,18	86,24	82,13	93,11	13,17
10	99,88	84,78	82,63	79,45	86,69	9,07
15	104,28	74,40	79,63	72,32	82,66	14,74
20	91,57	68,28	70,95	66,48	74,32	11,65
25	81,25	65,86	69,18	61,41	69,43	8,50
30	84,58	57,35	60,50	56,50	64,73	13,34
Vr(mL)	5,5	5	6,5	5,5	5,63	0,63
Ajuste no lineal						
Ka(h ⁻¹)	0,74	1,11	0,80	0,92	0,89	0,16
A ₀ (µg/mL)	117,91	100,82	94,04	90,42	100,80	12,20

Tabla 100: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL preparada a partir del producto C

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 160 µg/mL (D) Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	92,65	117,75	107,00	81,09	99,62	16,07
10	84,31	110,86	94,49	76,45	91,53	14,85
15	78,89	100,38	92,37	74,57	86,55	11,94
20	76,22	92,88	87,61	72,25	82,24	9,63
25	70,72	92,57	68,83	66,51	74,66	12,07
30	64,89	75,71	62,66	57,35	65,15	7,72
Vr(mL)	6,5	5	4,5	5	5,25	0,87
Ajuste no lineal						
Ka(h ⁻¹)	0,81	0,94	1,19	1,11	1,01	0,17
A ₀ (µg/mL)	97,94	128,41	119,40	103,01	112,19	14,17

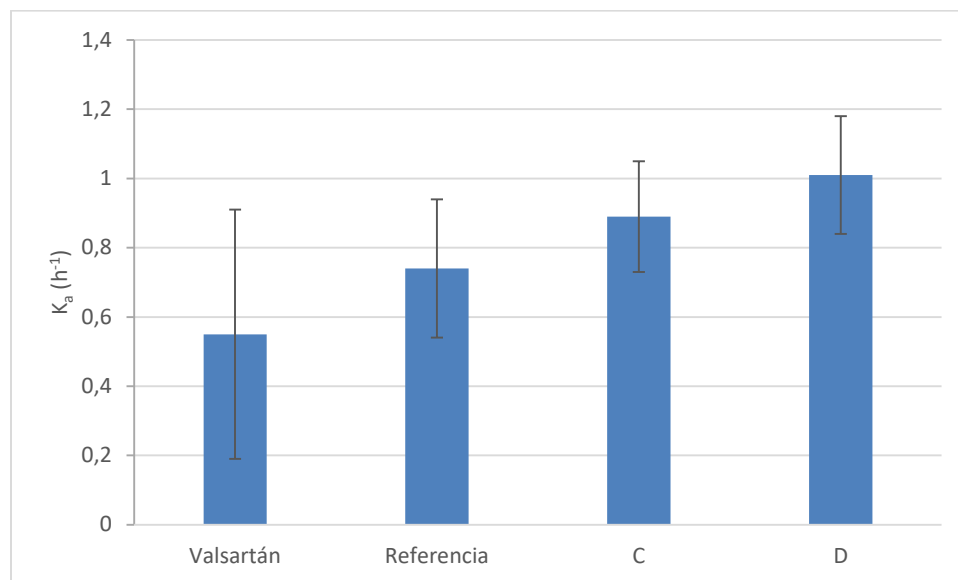
Tabla 101: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL preparada a partir del producto D



Gráfica 51: Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de las formulaciones en estudio valsartán (Referencia, C y D)

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	1,113	0,895	NS
ANOVA		0,151	NS

Tabla 102: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a las constantes de absorción en el modelo in situ de las formulaciones en estudio valsartán (Referencia, C y D)



Gráfica 52: Comparación de las constantes de absorción en el modelo in situ de valsartán y las formulaciones Referencia, C y D

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	2,736	0,086	NS
ANOVA		0,076	NS

Tabla 103: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a las constantes de absorción en el modelo in situ de valsartán y las formulaciones Referencia, C y D

2.7. Ensayos *in situ* para determinar el efecto de los excipientes sobre la permeabilidad de valsartán

A continuación se presentan tablas con los resultados de las constantes de absorción de valsartán obtenidas mediante el modelo *in situ* empleando soluciones de valsartán (como patrón) y soluciones del fármaco con los diferentes excipientes estudiados. En la gráfica N° 53 se representan la comparativa de los ensayos antes descritos.

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 160 µg/mL Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	103,60	105,68	103,07	134,01	119,83	113,24	13,49
10	103,36	103,88	94,16	133,86	115,58	110,17	15,27
15	103,96	102,91	86,61	132,15	112,05	107,54	16,57
20	97,16	100,93	84,15	130,93	101,62	102,96	17,14
25	91,75	98,82	76,74	128,55	92,28	97,63	19,09
30	83,06	93,66	66,36	125,36	81,01	89,89	22,09
Vr(mL)	7	7	4,5	7	5,5	6,20	1,15
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	0,50	0,26	0,95	0,16	0,89	0,55	0,36
A ₀ (µg/mL)	111,99	108,87	111,49	136,92	133,27	120,51	13,43

Tabla 104: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: valsartán (160 µg/mL)+crospovidona (0,32 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	147,02	145,04	121,22	127,68	146,70	137,53	12,18
10	136,00	138,52	110,57	117,87	138,96	128,38	13,24
15	129,47	127,24	107,55	116,79	133,85	122,98	10,66
20	119,73	119,80	104,71	108,55	120,82	114,72	7,52
25	110,77	110,11	97,32	99,99	116,64	106,96	8,06
30	102,25	101,05	96,92	97,98	107,92	101,22	4,33
Vr(mL)	5,5	5,5	6,5	6	6	5,90	0,42
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	0,85	0,86	0,53	0,65	0,74	0,73	0,14
A ₀ (µg/mL)	1158,11	157,84	1123,98	134,11	157,11	146,23	16,10

Tabla 105: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL en presencia de crospovidona a concentración de 0,32 mg/mL

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: valsartán (160 µg/mL)+estearato de magnesio (0,072 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	145,08	147,61	149,32	128,88	150,20	146,97	8,96
10	138,81	146,45	144,88	123,98	148,99	144,63	9,38
15	137,66	143,55	143,83	122,38	145,11	140,00	11,75
20	134,61	140,36	135,50	110,39	139,87	135,71	10,74
25	133,88	134,61	127,63	105,48	135,62	127,81	13,31
30	132,86	133,15	124,13	98,24	134,47	125,13	14,96
Vr(mL)	8,5	7,5	7	6,5	7	7,64	0,65
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	0,20	0,27	0,46	0,65	0,30	0,38	0,18
A ₀ (µg/mL)	145,28	152,35	156,98	138,37	155,18	149,63	7,71

Tabla 106: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL en presencia de estearato de magnesio a concentración de 0,072 mg/mL

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: valsartán (160 µg/mL)+celulosa microcristalina (0,60 mg/mL)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	131,02	152,40	150,50	150,31	150,62	146,97	8,96
10	128,11	150,83	148,14	149,66	146,40	144,63	9,38
15	119,66	147,08	143,93	148,52	140,83	140,00	11,75
20	122,02	144,41	137,44	147,08	127,61	135,71	10,74
25	104,86	138,92	131,36	134,38	129,51	127,81	13,31
30	99,65	137,82	130,47	132,66	125,03	125,13	14,96
Vr(mL)	7,7	8,5	8	7	7	7,74	0,56
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	0,64	0,26	0,38	0,32	0,48	0,42	0,15
A ₀ (µg/mL)	141,24	156,68	156,67	157,61	157,05	153,85	7,06

Tabla 107: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL en presencia de celulosa microcristalina a concentración de 0,60 mg/mL

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: valsartán (160 µg/mL)+macrogol (0,006 mg/mL)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	143,08	138,80	150,82	138,98	147,02	143,74	5,21
10	136,16	128,74	146,96	125,36	144,08	136,26	9,37
15	129,90	117,68	144,29	119,80	141,91	130,72	12,24
20	126,26	104,09	141,15	113,53	142,82	125,57	16,93
25	116,92	93,81	134,11	103,27	137,38	117,10	18,94
30	110,03	75,65	120,80	92,45	134,83	106,75	23,28
Vr(mL)	5,9	4	6,5	5,5	7,5	5,98	1,47
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	0,61	1,36	0,51	0,90	0,19	0,71	0,44
A ₀ (µg/mL)	151,17	159,07	159,52	149,13	149,50	153,68	5,19

Tabla 108: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL en presencia de macrogol a concentración de 0,006 mg/mL

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: valsartán (160 µg/mL)+hidroximetilcelulosa (0,06 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	23,76	80,56	82,88	29,15	86,82	60,63	31,34
10	22,01	77,28	77,10	26,48	82,49	57,07	30,09
15	20,62	78,11	77,93	25,10	83,92	57,14	31,42
20	15,20	77,21	71,65	22,68	79,99	53,35	31,66
25	13,00	75,34	61,70	20,77	75,37	49,24	30,18
30	11,52	66,39	47,64	18,93	62,58	41,41	25,05
Vr(mL)	3	7,5	5	4,5	6	5,20	1,68
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,78	0,34	1,07	1,02	0,62	0,97	0,54
A ₀ (µg/mL)	28,84	83,72	94,35	31,74	93,72	66,47	33,32

Tabla 109: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL en presencia de hidroximetilcelulosa a concentración de 0,06 mg/mL

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: valsartán (160 µg/mL)+ talco (0,006 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	128,55	139,09	130,10	136,86	135,97	134,11	4,55
10	120,18	135,44	123,46	133,96	129,45	128,50	6,59
15	114,65	132,84	117,77	138,01	121,46	124,95	10,03
20	108,92	129,00	114,88	128,03	111,67	118,50	9,39
25	105,73	127,26	107,25	130,46	113,77	116,89	11,39
30	99,18	123,58	100,39	122,61	107,33	110,62	11,81
Vr(mL)	6,5	8	5,5	7,5	6,5	6,80	0,97
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	0,60	0,28	0,59	0,24	0,58	0,46	0,18
A ₀ (µg/mL)	133,91	142,13	136,91	140,99	141,51	139,09	3,55

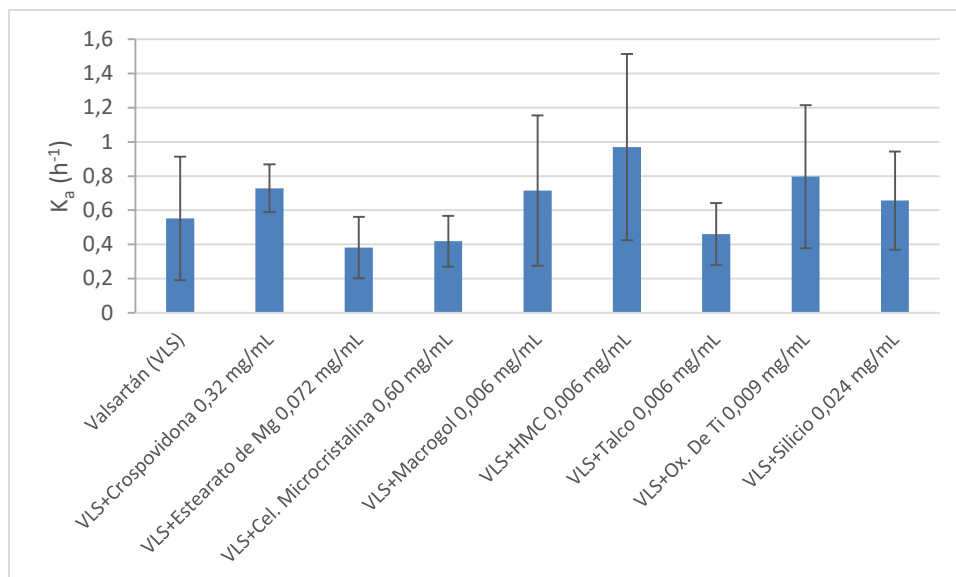
Tabla 110: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL en presencia de talco a concentración de 0,006 mg/mL

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: valsartán (160 µg/mL)+dióxido de titanio (0,009 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	56,30	40,95	81,50	78,90	79,78	67,49	18,08
10	41,31	39,61	75,89	75,07	75,17	61,41	19,14
15	36,37	38,91	70,80	73,11	71,83	58,20	18,81
20	37,90	37,84	63,37	69,07	67,27	55,09	15,85
25	35,96	37,43	47,22	63,57	61,15	49,07	12,91
30	36,52	36,76	49,11	62,76	58,51	48,73	12,09
Vr(mL)	7	8,3	7,5	6	5,5	6,86	1,13
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,04	0,26	1,34	0,58	0,76	0,80	0,42
A ₀ (µg/mL)	54,55	41,54	93,85	83,11	85,53	71,72	22,45

Tabla 111: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL en presencia de dióxido de titanio a concentración de 0,009 mg/mL

Concentración remanente de valsartán en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: valsartán (160 µg/mL)+silicio (0,024 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	137,61	148,03	148,03	148,98	140,94	144,72	5,12
10	123,95	143,15	145,31	145,88	135,45	138,75	9,26
15	122,29	135,48	141,79	143,03	128,36	134,19	8,85
20	113,10	136,77	137,77	138,51	120,52	129,33	11,75
25	101,54	133,60	128,59	131,13	106,77	120,33	14,98
30	88,90	121,09	117,77	124,48	88,14	108,08	18,01
Vr(mL)	4	7	6	6,5	4	5,50	1,41
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	0,94	0,41	0,51	0,42	0,99	0,65	0,29
A ₀ (µg/mL)	149,57	153,21	157,89	156,42	158,70	155,16	3,76

Tabla 112: Concentración de valsartán remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de valsartán a una concentración de 160 µg/mL en presencia de silicio a concentración de 0,024 mg/mL



Gráfica 53: Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de valsartán y los excipientes de las formulaciones en estudio (Referencia, C y D)

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	1,926	0,086	NS
ANOVA		0,123	NS

Tabla 113: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las constantes de absorción en el modelo in situ de valsartán y los excipientes de las formulaciones en estudio

3. Clonazepam

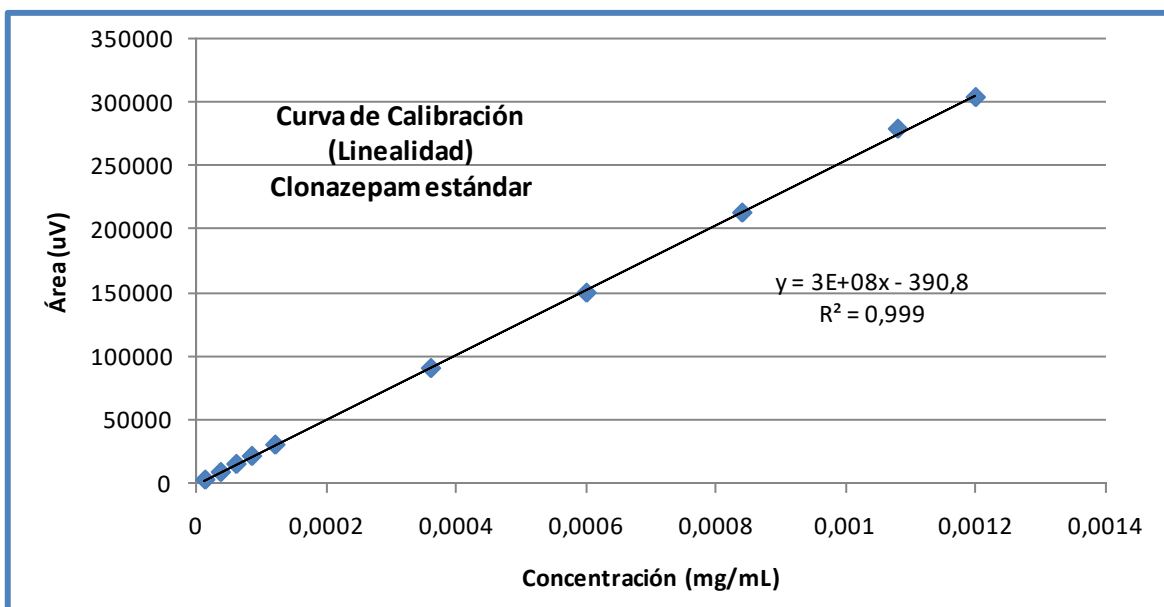
3.1. Validación del método analítico para clonazepam

3.1.1. Linealidad

Se realizó el estudio de linealidad a la curva de calibración utilizada para cuantificar clonazepam. A continuación se muestran tales resultados en la tabla N° 114 y en la gráfica N° 54.

Linealidad	Criterios de aceptación			
Coeficiente de correlación r	0,99989			
Coeficiente de determinación r ²	0,99978		Cumple r ² ≥ 0,99	
Error típico S _{y/x}	1848			
Nº determinaciones	10			
Pendiente	255118446			
Intercepción eje Y	-380,8			
DE del intercepto S _a	829,6			
t de student (n-2)	2,3			
Límite de detección	0,00001			
Límite de cuantificación	0,00003			
Media ± DE (factores de respuesta)	25299981733 ± 367294314			
CV % factores de respuesta	1,45			Cumple CV % ≤ 2%
Intervalo de confianza del intercepto eje Y	1913	Valor min.	Valor máx.	Cumple: Intervalo de confianza del intercepto incluye el cero
		-2303,9	1522,2	

Tabla 114: Resultados de la prueba de linealidad y criterios de aceptación para clonazepam



Gráfica 54: Curva de calibración clonazepam, linealidad

3.1.2. Exactitud

Los resultados de la exactitud obtenidos durante la validación del método para clonazepam se observan en la tabla N° 115, en donde se presentan los promedios de errores relativos y porcentaje de recuperación de los tres niveles de los ensayos.

Exactitud	Nivel 1 (5%)	Nivel 2 (50%)	Nivel 3 (100%)	Criterios de aceptación	
Er	1,05	0,088	0,22	$Er \leq 2$	Cumple
% Recuperación	99,79	100,17	100,65	% R: 95-105	Cumple

Tabla 115: Resultados de la prueba de exactitud y criterios de aceptación para clonazepam

3.1.3. Precisión (repetibilidad) y precisión intermedia

En la tabla N° 116 se presentan los CV % de la repetibilidad del método para clonazepam.

Exactitud	5%	50%	100%	Criterios de aceptación	
% CV	1,42	0,76	0,18	CV % \leq 2	Cumple

Tabla 116: Resultados de los análisis de repetibilidad para clonazepam

En la tabla N° 117 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la precisión intermedia, para lo cual se aplicó el “Test de comparación de medias” de las mismas concentraciones. Como las varianzas iguales se realizó el test de student.

Puntos	5%		50%		100%	
Parámetros	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Media	99,56	100,01	98,78	99,24	100,85	101,39
Varianza	0,41	0,37	0,18	0,22	0,072	0,080
Comparación de Varianzas						
F critico (tabla)	4,28		4,28		4,28	
F calculado	1,1081		1,2220		1,1110	
Varianza común	0,3900		0,2000		0,0760	
Varianzas iguales						
Estadístico t exp.	0,9349		1,0286		1,2752	
Valor critico de t (2 colas)	2,2281		2,2281		2,2281	
Calificación t	Cumple		Cumple		Cumple	

Tabla 117: Resumen de parámetros y comparación de varianzas para la aplicación del test de comparación de medias en el análisis de precisión intermedia para clonazepam

3.1.4. Estabilidad

Los resultados de estudio de estabilidad para clonazepam comparan los porcentajes de recuperación de las muestras recién preparadas con las almacenadas a 20°C (bancada) y a 5°C (refrigeradas) durante 24 y 48 horas (tabla 118).

Estabilidad	Día 1		Día 2		
Temperatura	5°C	20°C	5°C	20°C	
% Recuperación	98,89	98,72	99,31	98,87	Cumple

Tabla 118: Resultados de la prueba de estabilidad para clonazepam

3.1.5. Influencia de filtro

Durante la evaluación de la influencia de filtro se usó una muestra al 100% y el porcentaje de recuperación fue de un 99,6%, por lo tanto **Cumple**.

3.1.6. Especificidad

La metodología analítica usada para cuantificar a clonazepam es específica y es selectiva y la interferencia es menor que 2%, por lo tanto **Cumple**.

3.1.7. Robustez

Como en los métodos para los otros principios activos estudiados, se evaluó la robustez del método dentro de los rangos establecidos de prueba, para lo cual se estableció como parámetro el tailing y los factores objeto de modificación fueron flujo y composición del medio. A continuación se muestran los resultados de los ensayos de robustez (tabla 119).

Factor	Efecto (Tailing)	IC (factor $\pm t^*/\sqrt{n}$)	
Flujo	-0,010	0,0141 – (- 0,0101)	Cumple
Composición del medio	0,002	0,0001 – (- 0,0241)	Cumple

Tabla 119: Resultados de la prueba de robustez para clonazepam

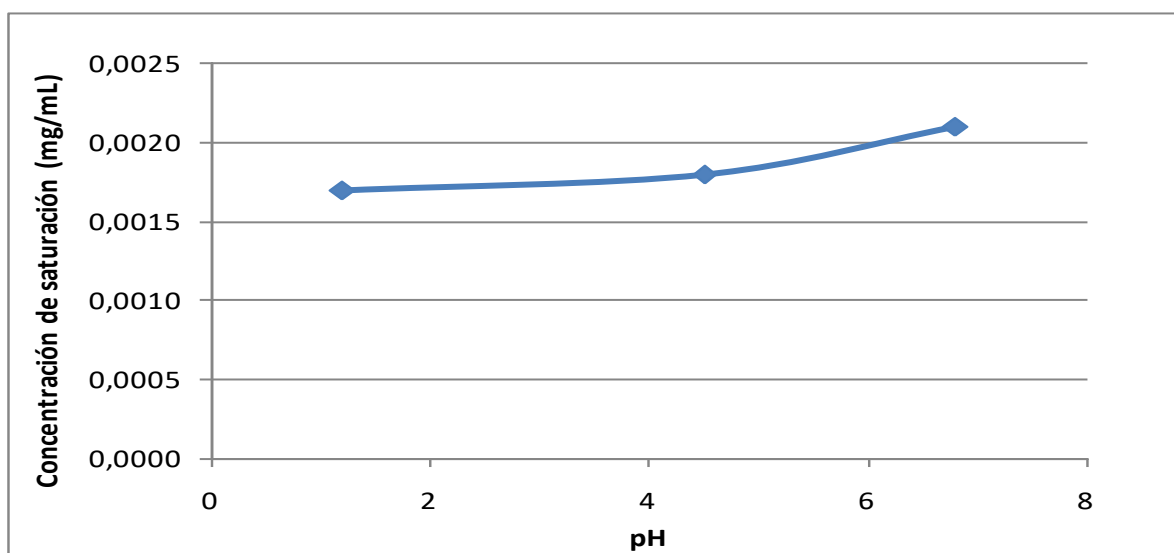
3.2. Concentración de saturación de clonazepam

3.2.1. Medios de disolución biofarmacéuticos

En la tabla N° 120 se presentan los resultados del estudio de solubilidad de clonazepam en condiciones de saturación a 37°C realizados a los tres pH representativos del tracto gastrointestinal. En la gráfica N° 55 se muestra el perfil de solubilidad-pH de clonazepam.

pH	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
1,2	0,0012	0,0017	0,0004	25,64	4,71
	0,0019				
	0,0020				
4,5	0,0014	0,0018	0,0004	19,88	4,53
	0,0018				
	0,0021				
6,8	0,0018	0,0021	0,0003	12,18	3,87
	0,0023				
	0,0021				

Tabla 120: Concentración de saturación de clonazepam a los distintos pH estudiados



Gráfica 55: Perfil de solubilidad en función del pH de clonazepam a 37°C

3.2.2. Medios de disolución biopredictivos

En la tabla N° 121 se muestran las concentraciones experimentales (individuales y en promedio) de clonazepam en condición de saturación en medios biopredictivos FaSSIF y FaSSGF realizado a 37°C por 24 horas.

Medio	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
FaSSGF	0,0031	0,0030	0,0001	3,33	2,67
	0,0030				
	0,0029				
FaSSIF	0,0036	0,0035	0,0003	7,56	2,29
	0,0037				
	0,0032				

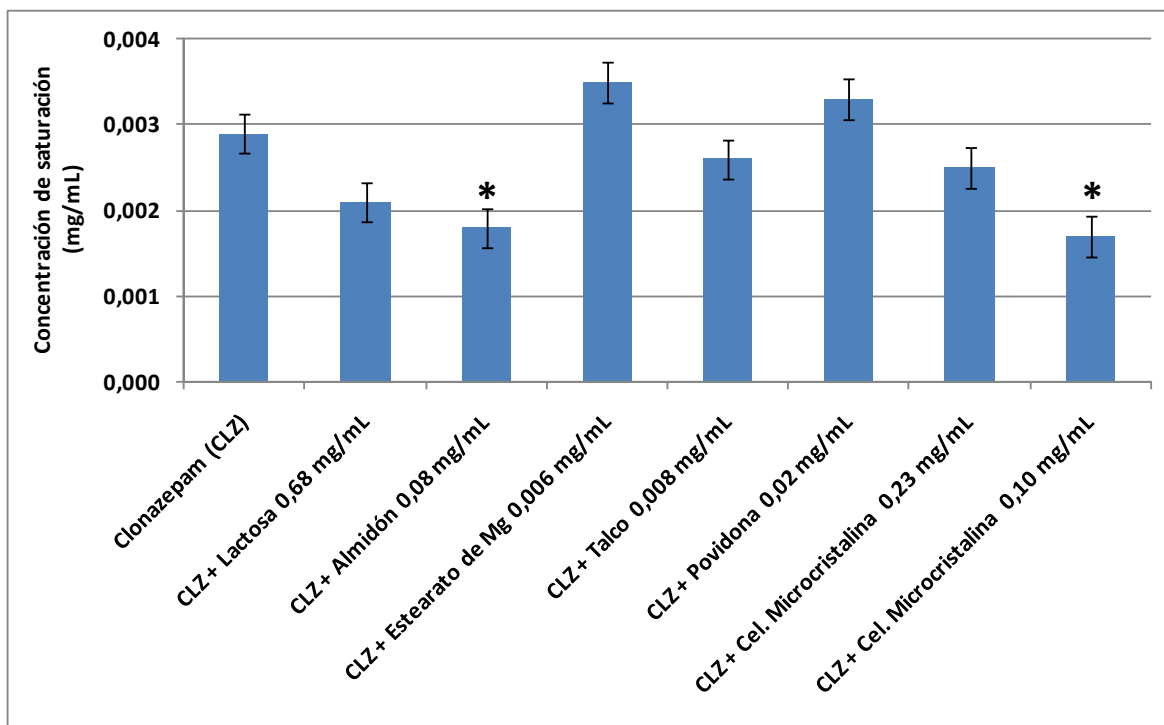
Tabla 121: Concentración de saturación de clonazepam en medios biopredictivos

3.2.3. Excipientes

En la tabla N° 122 se presentan las concentraciones experimentales de clonazepam en condición de saturación en presencia de cada excipiente en 24 horas a 37°C en agua. La comparación de estos resultados se muestra en la gráfica N° 56.

Excipiente	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
Clonazepam	0,0028	0,0029	0,0002	5,21	2,73
	0,0029				
	0,0031				
Lactosa 0,68 mg/mL	0,0017	0,0021	0,0004	17,17	3,81
	0,0024				
	0,0022				
Almidón 0,08 mg/mL	0,0015	0,0018	0,0003	16,66	4,36
	0,0019				
	0,0021				
Estearato de Magnesio 0,006 mg/mL	0,0036	0,0035	0,0002	4,41	2,31
	0,0033				
	0,0035				
Talco 0,008 mg/mL	0,0023	0,0026	0,0003	11,90	3,12
	0,0025				
	0,0029				
Povidona 0,02 mg/mL	0,0031	0,0033	0,0002	4,68	2,45
	0,0033				
	0,0034				
Celulosa Microcristalina 0,23 mg/mL	0,0028	0,0025	0,0003	12,06	3,16
	0,0026				
	0,0022				
Celulosa Microcristalina 0,10 mg/mL	0,0014	0,0017	0,0003	15,10	4,80
	0,0019				
	0,0017				

Tabla 122: Concentración de saturación de clonazepam en presencia de excipientes



Gráfica 56: Concentración de saturación de clonazepam en presencia de excipientes

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	0,833	0,575	NS
ANOVA		<0,0001	S

Tabla 123: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a la concentración de saturación de clonazepam en presencia de excipientes de las formulaciones en estudio (Referencia, E y F)

Prueba de Comparación Múltiple de Scheffe	
Excipientes	Referencia
Lactosa	NS
Almidón	S
Estearato de Magnesio	NS
Talco	NS
Povidona	NS
Cel. Microcristalina (0,23 mg/mL)	NS
Cel. Microcristalina (0,10 mg/mL)	S

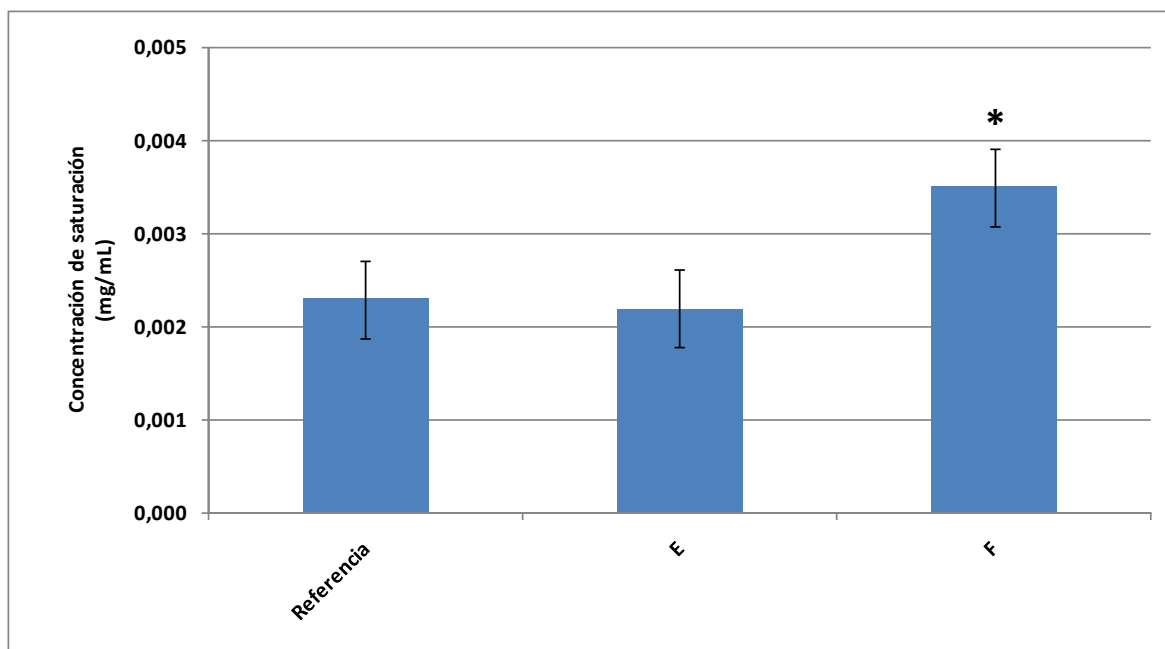
Tabla 124: Resultado de la comparación múltiple de Scheffe de la concentración de saturación de clonazepam en presencia de excipientes de las formulaciones en estudio (Referencia, E y F)

3.2.4. Producto Terminado

Al estudiar la concentración en condiciones de saturación en agua de clonazepam a las 24 horas y a 37°C, a partir de las formulaciones, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla N° 125 y en la gráfica N° 57.

Formulación	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
Referencia	0,0019	0,0023	0,0004	17,83	3,53
	0,0027				
	0,0022				
E	0,0019	0,0022	0,0003	14,10	3,69
	0,0025				
	0,0021				
F	0,0037	0,0034	0,0003	7,78	2,31
	0,0033				
	0,0034				

Tabla 125: Concentración de saturación de las formulaciones en estudio de clonazepam



Gráfica 57: Concentración de saturación de las formulaciones en estudio de clonazepam

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	0,621	0,569	NS
ANOVA		0,004	S

Tabla 126: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a la concentración de saturación de clonazepam de las formulaciones en estudio (Referencia, E y F)

Prueba de Comparación Múltiple de Scheffe	
Formulación	Referencia
E	NS
F	S

Tabla 127: Resultado de la comparación múltiple de Scheffe de la concentración de saturación de clonazepam de las formulaciones en estudio (Referencia, E y F)

3.3. Ensayo de disgregación

En la tabla N° 128 se observan los tiempos de disgregación de las formulaciones E y F y del producto de referencia de clonazepam, según lo especificado en la EP.

Formulación	Tiempo de disgregación individual (min)						Promedio (min)	DE	CV %
	1	2	3	4	5	6			
Referencia	3,9	4,0	4,0	4,1	4,1	4,1	4,0	0,1	1,9
E	4,2	4,8	4,5	3,9	3,8	3,0	4,0	0,6	15,6
F	3,8	4,1	3,6	4,2	3,2	3,8	3,8	0,4	9,6

Tabla 128: Tiempo de disgregación de las formulaciones en estudio de clonazepam

3.4. Perfiles de disolución

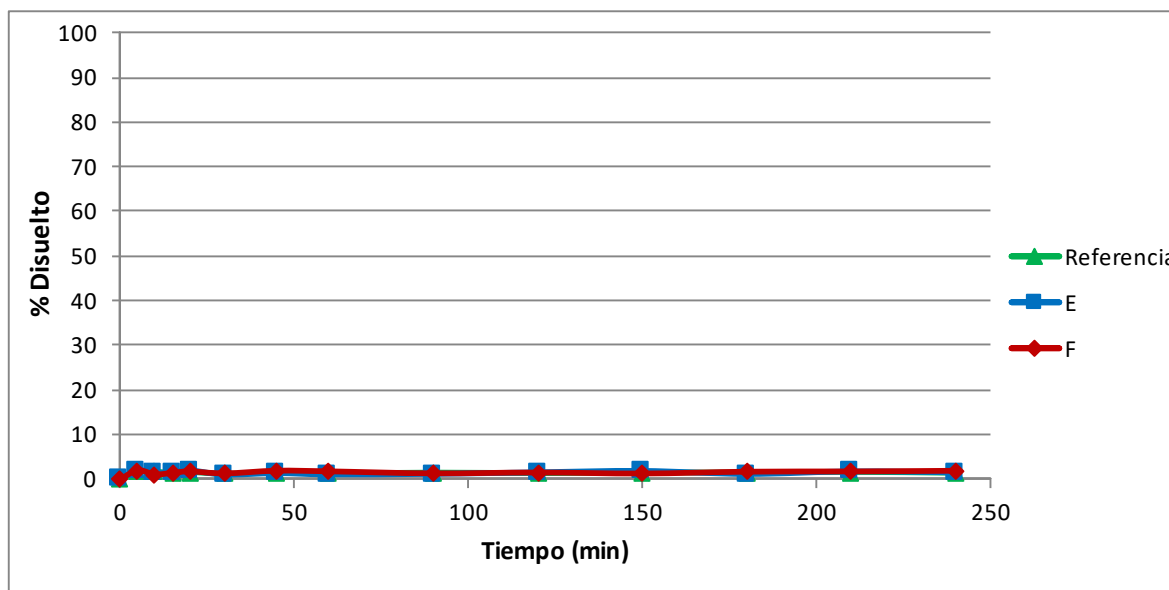
3.4.1. Aparato de disolución II, paleta

En las tablas de la 129 a la 131 se muestran los porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo del producto de referencia y las formulaciones E y F en los medios

recomendados por la guía de bioexenciones de la EMA. Las representaciones gráficas de estos perfiles se observan en las gráficas N° 58, 59 y 60.

pH 1,2 (tampón cloruro 50 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	1,70 \pm 0,05	3,00	1,99 \pm 0,07	3,60	1,99 \pm 0,13	6,45
10	1,67 \pm 0,04	2,63	1,37 \pm 0,09	6,68	1,08 \pm 0,10	9,41
15	1,40 \pm 0,04	2,56	1,53 \pm 0,08	5,34	1,42 \pm 0,11	7,53
20	1,60 \pm 0,08	4,87	1,99 \pm 0,06	2,86	1,74 \pm 0,07	4,19
30	1,23 \pm 0,07	5,39	1,04 \pm 0,06	5,93	1,31 \pm 0,03	2,42
45	1,45 \pm 0,10	6,88	1,35 \pm 0,08	5,93	1,90 \pm 0,06	3,10
60	1,29 \pm 0,04	2,76	1,08 \pm 0,09	0,09	1,76 \pm 0,07	3,98
90	1,48 \pm 0,04	2,39	1,18 \pm 0,05	0,05	1,30 \pm 0,07	5,36
120	1,36 \pm 0,07	4,81	1,55 \pm 0,09	0,09	1,50 \pm 0,04	2,66
150	1,47 \pm 0,07	4,92	1,86 \pm 0,10	0,10	1,27 \pm 0,09	6,81
180	1,52 \pm 0,06	3,79	1,17 \pm 0,03	0,03	1,68 \pm 0,04	2,61
210	1,64 \pm 0,04	2,74	1,75 \pm 0,08	0,08	1,74 \pm 0,07	4,19
240	1,43 \pm 0,08	5,56	1,53 \pm 0,03	1,93	1,89 \pm 0,06	3,22

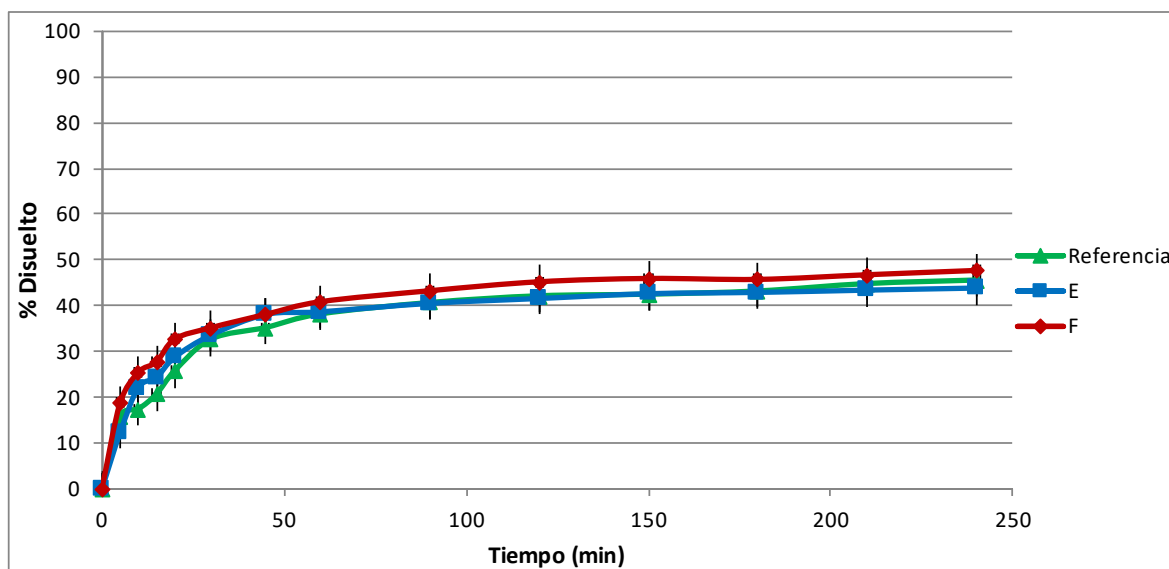
Tabla 129: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio tampón pH 1,2 de cloruro de sodio 50 mM empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 58: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio tampón pH 1,2 de cloruro de sodio 50 mM (n=6)

pH 4,5 (tampón acetato 36,5 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	15,99 \pm 0,58	3,62	12,31 \pm 0,38	3,10	18,77 \pm 1,36	7,24
10	17,49 \pm 0,19	1,08	22,17 \pm 0,96	4,33	25,49 \pm 2,33	9,13
15	20,76 \pm 0,81	3,92	24,37 \pm 0,64	2,61	27,76 \pm 2,03	7,31
20	25,85 \pm 0,53	2,07	28,79 \pm 0,71	0,71	32,74 \pm 1,48	4,52
30	32,76 \pm 0,21	0,65	33,63 \pm 1,35	1,35	35,23 \pm 1,05	2,97
45	35,28 \pm 0,63	1,79	38,10 \pm 1,50	1,50	38,14 \pm 3,80	9,97
60	38,24 \pm 1,22	3,18	38,68 \pm 1,49	1,49	40,90 \pm 2,33	5,70
90	40,72 \pm 1,33	3,27	40,53 \pm 2,21	2,21	43,29 \pm 4,23	9,76
120	42,19 \pm 1,67	3,96	41,59 \pm 2,06	2,06	45,25 \pm 2,91	6,43
150	42,54 \pm 1,20	2,82	42,64 \pm 2,64	6,18	45,97 \pm 2,18	4,74
180	43,25 \pm 0,84	1,95	42,92 \pm 3,38	7,87	45,77 \pm 2,69	5,88
210	44,86 \pm 2,51	5,59	43,42 \pm 3,26	7,51	46,78 \pm 1,63	3,49
240	45,63 \pm 2,97	6,52	43,87 \pm 1,66	3,77	47,72 \pm 3,26	6,82

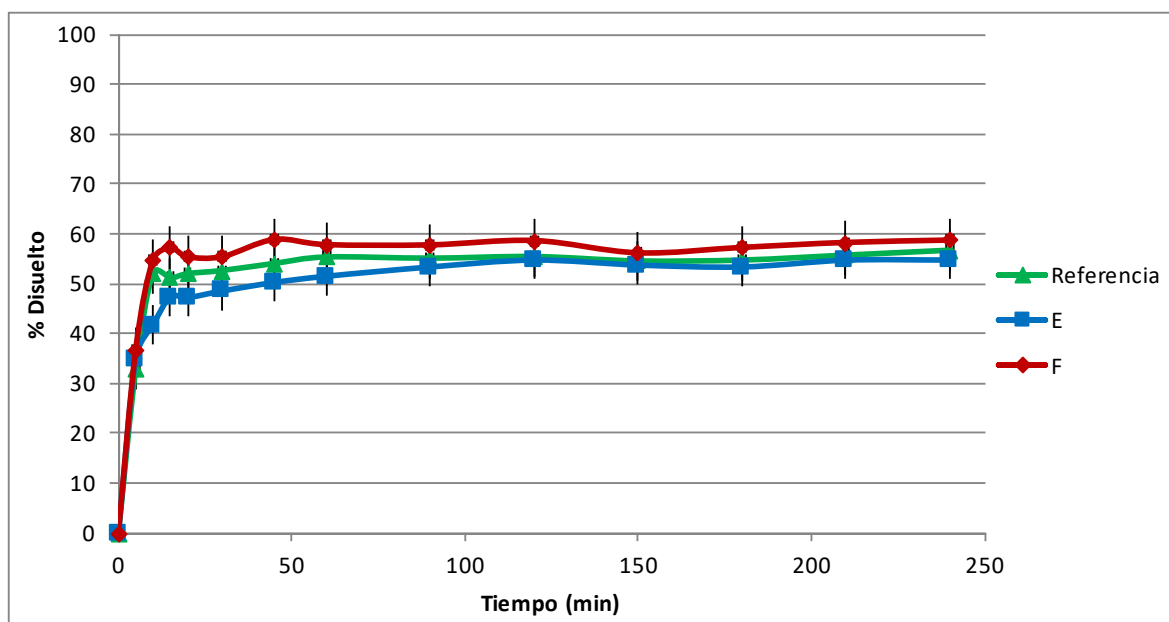
Tabla 130: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio tampón pH 4,5 de acetato de sodio 36,5 mM empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 59: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio tampón pH 4,5 de acetato de sodio 36,5 mM (n=6)

pH 6,8 (tampón fosfato 50 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	32,86 \pm 2,38	7,24	35,00 \pm 3,27	9,34	36,87 \pm 3,57	9,67
10	52,19 \pm 4,01	7,68	41,76 \pm 3,95	9,46	54,79 \pm 2,38	4,35
15	51,18 \pm 3,27	6,39	47,36 \pm 1,57	3,32	57,22 \pm 2,20	3,85
20	52,03 \pm 2,73	5,24	47,21 \pm 1,64	3,47	55,42 \pm 2,71	4,89
30	52,67 \pm 1,61	3,05	48,55 \pm 2,14	4,41	55,44 \pm 3,95	7,12
45	54,08 \pm 3,26	6,03	50,26 \pm 2,48	4,94	58,88 \pm 1,93	3,28
60	55,37 \pm 1,66	2,99	51,50 \pm 3,80	7,39	57,85 \pm 1,53	2,65
90	55,13 \pm 2,03	3,68	53,36 \pm 1,40	2,62	57,80 \pm 2,69	4,65
120	55,46 \pm 2,61	4,71	54,74 \pm 0,82	1,50	58,67 \pm 3,25	5,54
150	54,58 \pm 1,87	3,42	53,75 \pm 2,48	4,61	56,20 \pm 1,81	3,22
180	54,75 \pm 1,73	3,16	53,37 \pm 3,28	6,16	57,29 \pm 3,46	6,03
210	55,74 \pm 1,03	1,85	54,73 \pm 2,38	4,35	58,29 \pm 1,24	2,12
240	56,73 \pm 1,41	2,48	54,75 \pm 2,18	3,99	58,76 \pm 0,75	1,27

Tabla 131: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 50 mM, empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)

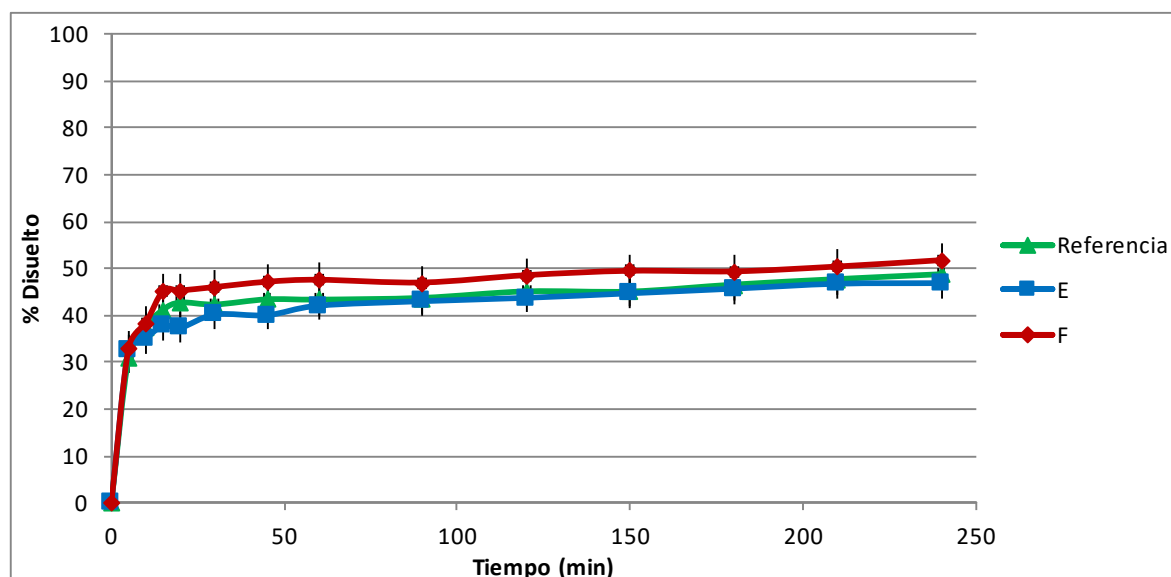


Gráfica 60: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 50 mM (n=6)

Los valores del porcentaje disuelto de clonazepam en función del tiempo del producto de referencia y las formulaciones E y F en el medio pH 6,8 de menor concentración iónica que la establecida en la EP se muestran en la tabla N° 132 y la gráfica N° 61.

pH 6,8 (tampón fosfato 10 mM). Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	30,95 \pm 1,62	5,23	32,77 \pm 1,31	4,00	33,09 \pm 2,57	7,76
10	37,62 \pm 1,97	5,22	35,15 \pm 2,79	7,93	38,41 \pm 2,21	5,75
15	41,24 \pm 2,65	6,43	37,86 \pm 1,03	2,73	45,22 \pm 1,87	4,15
20	42,75 \pm 1,44	3,37	37,37 \pm 2,44	2,44	45,32 \pm 1,39	3,07
30	42,33 \pm 1,14	2,69	40,18 \pm 1,04	1,04	46,06 \pm 0,99	2,14
45	43,42 \pm 0,58	1,34	40,05 \pm 2,23	2,23	47,17 \pm 4,44	9,41
60	43,37 \pm 1,18	2,72	42,08 \pm 2,20	2,20	47,60 \pm 3,35	7,04
90	43,74 \pm 2,44	5,57	43,03 \pm 2,95	2,95	47,02 \pm 3,88	8,25
120	45,12 \pm 1,58	3,49	43,74 \pm 1,14	1,14	48,58 \pm 3,79	7,81
150	45,09 \pm 0,86	1,91	44,71 \pm 1,27	2,84	49,51 \pm 4,34	8,76
180	46,57 \pm 2,13	4,57	45,70 \pm 2,37	5,18	49,39 \pm 2,52	5,10
210	47,75 \pm 1,28	2,69	46,75 \pm 1,26	2,70	50,43 \pm 1,55	3,07
240	48,79 \pm 1,58	3,23	46,87 \pm 0,91	1,94	51,79 \pm 3,06	5,92

Tabla 132: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 10 mM empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)

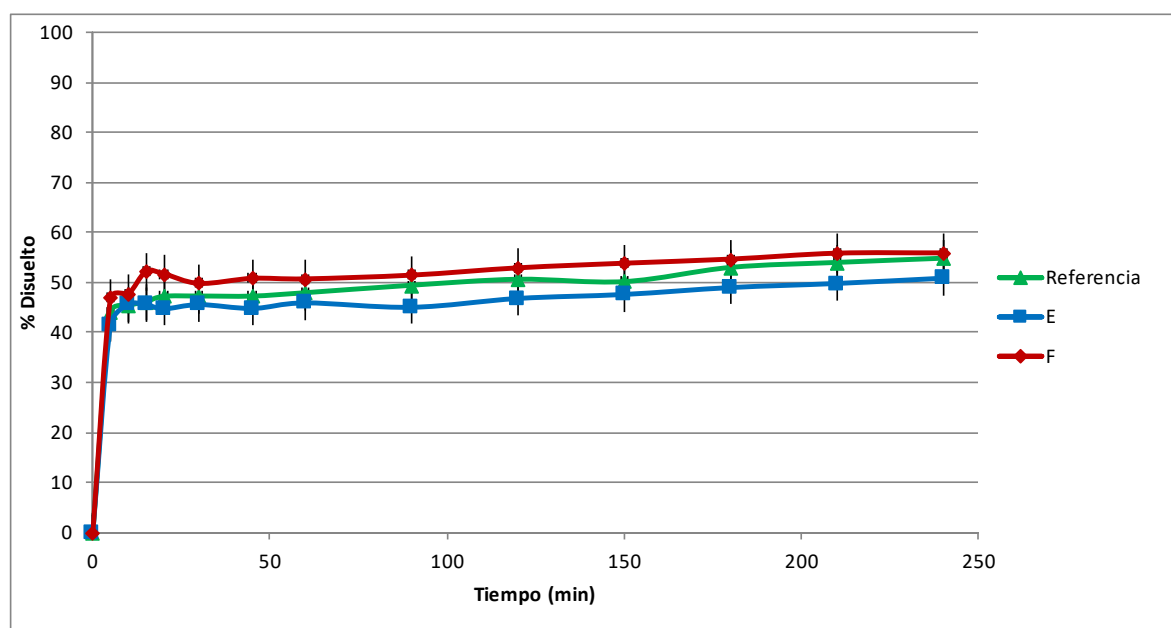


Gráfica 61: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio tampón pH 6,8 de fosfato diácido de potasio 10 mM (n=6)

En las tablas de la N° 133 a la 138 y las gráficas de la N° 62 a la 67 se muestran los porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo del producto de referencia y las formulaciones E y F en los medios a pH 6,5 combinados con LSS 0,1 y 1%.; Tween 20 con 0,10; 0,15; 0,20; 0,30%.

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con LSS 0,1%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	44,09 \pm 2,24	5,07	41,50 \pm 2,34	5,63	46,92 \pm 4,56	9,72
10	45,37 \pm 2,40	5,29	45,57 \pm 3,65	8,01	47,67 \pm 4,09	8,58
15	46,17 \pm 1,89	4,10	45,57 \pm 3,63	7,96	52,19 \pm 3,11	5,96
20	47,22 \pm 2,13	4,52	44,70 \pm 3,08	6,90	51,74 \pm 1,77	3,42
30	47,28 \pm 1,17	2,47	45,56 \pm 2,62	5,75	49,79 \pm 2,30	4,63
45	47,26 \pm 1,19	2,51	44,79 \pm 1,53	3,42	50,81 \pm 1,57	3,09
60	47,94 \pm 1,20	2,51	45,90 \pm 3,03	6,61	50,70 \pm 1,85	3,65
90	49,43 \pm 1,21	2,46	45,02 \pm 1,56	3,47	51,45 \pm 4,15	8,06
120	50,62 \pm 1,22	2,41	46,79 \pm 1,62	3,45	52,91 \pm 4,49	8,48
150	50,16 \pm 2,22	4,42	47,59 \pm 2,03	4,27	53,84 \pm 0,71	1,32
180	53,00 \pm 2,22	4,20	48,97 \pm 1,16	2,36	54,66 \pm 2,20	4,03
210	53,99 \pm 1,21	2,25	49,78 \pm 2,12	4,27	55,84 \pm 2,70	4,84
240	54,84 \pm 1,20	2,18	50,84 \pm 1,05	2,06	55,89 \pm 2,68	4,80

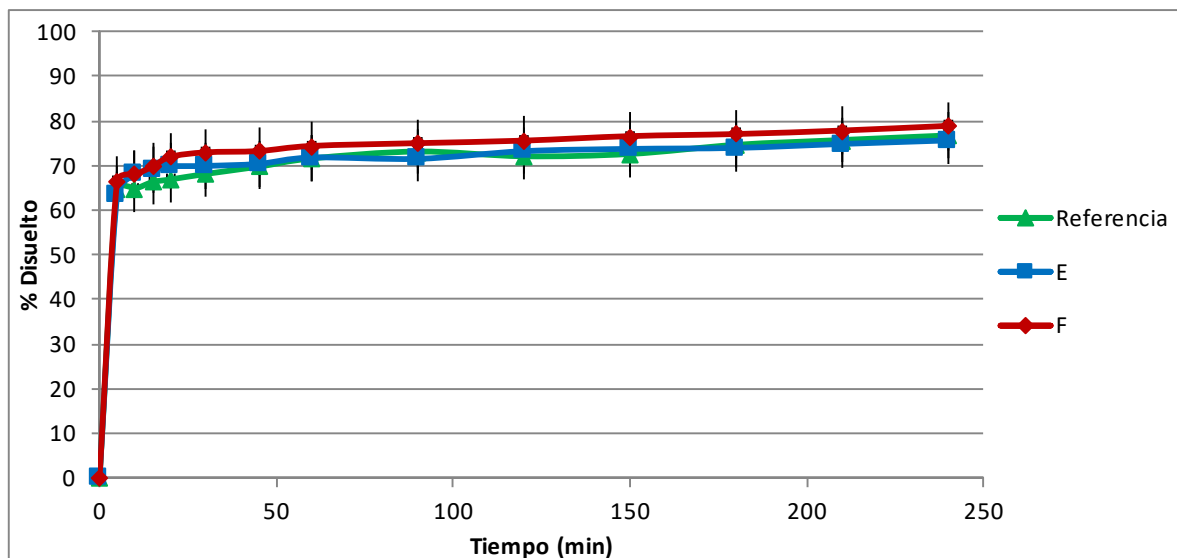
Tabla 133: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 0,1% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 62: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 0,1% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con LSS 1%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV(%)	Media \pm DE	CV(%)	Media \pm DE	CV(%)
5	64,65 \pm 1,39	2,16	63,44 \pm 4,72	7,44	66,53 \pm 5,00	7,51
10	64,82 \pm 1,93	2,98	68,03 \pm 5,17	7,60	67,98 \pm 6,70	9,86
15	66,31 \pm 1,24	1,87	68,94 \pm 6,29	9,12	69,77 \pm 6,60	9,46
20	66,89 \pm 1,78	2,67	69,79 \pm 4,19	6,00	71,95 \pm 6,09	8,46
30	68,12 \pm 2,69	3,95	69,92 \pm 5,53	7,91	72,96 \pm 5,17	7,09
45	69,75 \pm 2,10	3,01	70,38 \pm 3,92	5,57	73,25 \pm 4,39	6,00
60	71,59 \pm 1,75	2,45	71,80 \pm 3,08	4,29	74,40 \pm 3,73	5,02
90	73,14 \pm 3,28	4,49	71,51 \pm 2,28	3,19	75,02 \pm 2,70	3,59
120	72,08 \pm 1,22	1,69	73,22 \pm 1,85	2,53	75,58 \pm 1,95	2,58
150	72,60 \pm 2,13	2,94	73,73 \pm 1,53	2,08	76,59 \pm 1,41	1,84
180	74,64 \pm 1,33	1,78	73,95 \pm 1,27	1,72	77,06 \pm 1,02	1,32
210	75,72 \pm 3,46	4,57	74,84 \pm 4,03	5,39	77,84 \pm 4,17	5,36
240	76,75 \pm 3,13	4,08	75,63 \pm 3,83	5,07	78,89 \pm 4,10	5,20

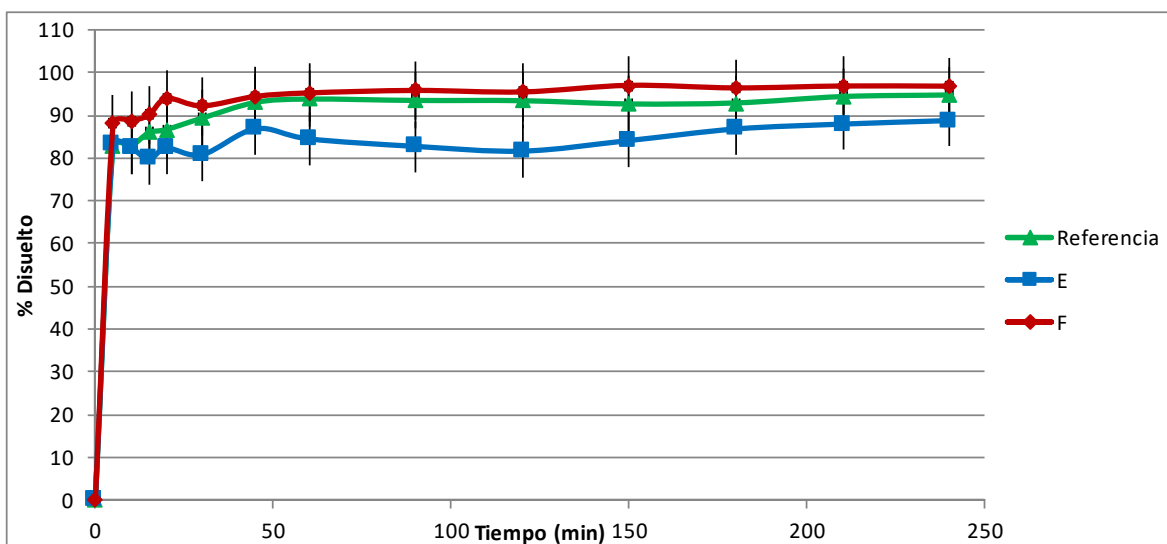
Tabla 134: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 1%, empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 63: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con LSS 1% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,30%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	82,76 \pm 5,38	6,50	83,34 \pm 5,49	6,59	88,02 \pm 6,06	6,88
10	82,84 \pm 5,38	6,50	82,39 \pm 7,18	8,71	88,74 \pm 4,06	4,57
15	85,89 \pm 5,41	6,30	79,76 \pm 7,50	9,40	90,01 \pm 8,32	9,24
20	86,66 \pm 5,36	6,19	82,29 \pm 7,58	9,21	93,92 \pm 5,50	5,86
30	89,32 \pm 5,28	5,91	80,79 \pm 2,59	3,20	92,18 \pm 7,82	8,49
45	92,99 \pm 5,05	5,43	86,82 \pm 1,44	1,66	94,39 \pm 8,65	9,16
60	93,77 \pm 4,82	5,14	84,46 \pm 3,69	4,37	95,21 \pm 7,98	8,38
90	93,45 \pm 3,90	4,17	82,71 \pm 4,49	5,43	95,79 \pm 1,46	1,52
120	93,39 \pm 2,70	2,89	81,61 \pm 4,89	5,99	95,44 \pm 1,92	2,01
150	92,63 \pm 5,98	6,46	84,09 \pm 5,12	6,08	96,98 \pm 1,94	2,00
180	92,87 \pm 5,74	6,19	86,79 \pm 5,24	6,03	96,38 \pm 2,34	2,43
210	94,36 \pm 5,41	5,73	87,92 \pm 5,32	6,05	96,83 \pm 2,21	2,29
240	94,73 \pm 5,01	5,28	88,75 \pm 5,37	6,05	96,78 \pm 5,34	5,52

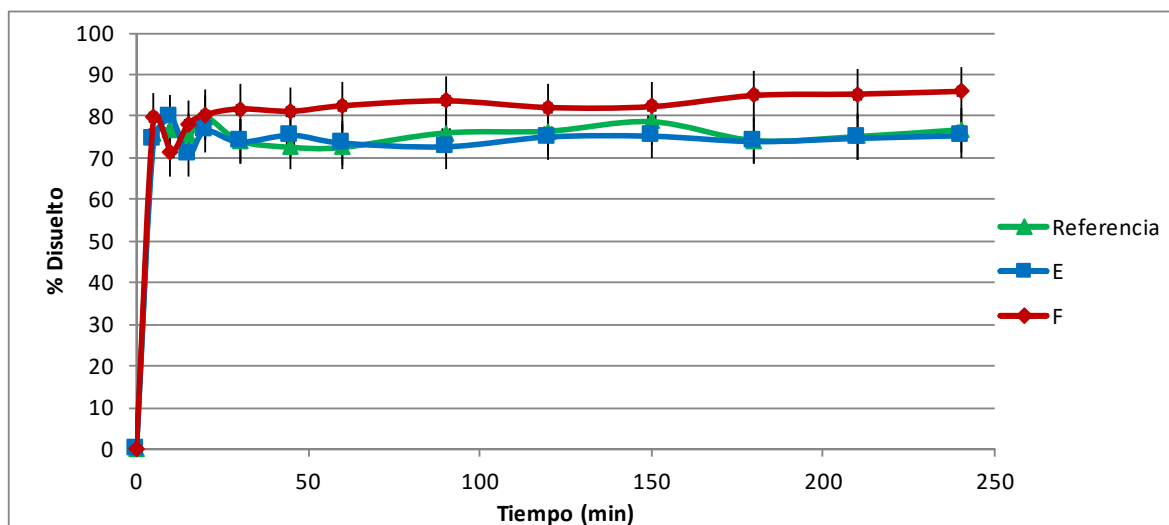
Tabla 135: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,30%, empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 64: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,30% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,20%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	75,91 \pm 4,68	6,17	74,25 \pm 4,89	6,58	79,58 \pm 5,98	7,51
10	76,45 \pm 3,37	4,41	79,70 \pm 4,51	5,66	71,32 \pm 6,19	8,69
15	75,13 \pm 3,18	4,23	70,65 \pm 3,66	5,18	77,92 \pm 6,56	8,42
20	79,77 \pm 2,53	3,18	76,51 \pm 1,09	1,43	80,35 \pm 6,52	8,11
30	74,10 \pm 2,92	3,94	73,80 \pm 3,50	4,74	81,77 \pm 4,36	5,33
45	72,55 \pm 2,88	3,97	75,43 \pm 3,95	5,24	81,20 \pm 5,19	6,39
60	72,52 \pm 5,02	6,92	73,55 \pm 4,22	5,74	82,52 \pm 6,16	7,47
90	75,98 \pm 1,96	2,58	72,66 \pm 4,38	6,03	83,71 \pm 3,60	4,30
120	76,41 \pm 1,40	1,83	75,03 \pm 4,42	5,89	82,10 \pm 3,55	4,33
150	78,69 \pm 1,05	1,34	75,21 \pm 4,45	5,92	82,31 \pm 4,18	5,08
180	74,16 \pm 1,02	1,37	73,92 \pm 4,51	6,11	85,00 \pm 4,59	5,40
210	75,12 \pm 2,20	2,93	74,68 \pm 2,42	3,24	85,33 \pm 4,58	5,37
240	76,76 \pm 2,28	2,97	75,33 \pm 4,85	6,44	85,99 \pm 2,54	2,96

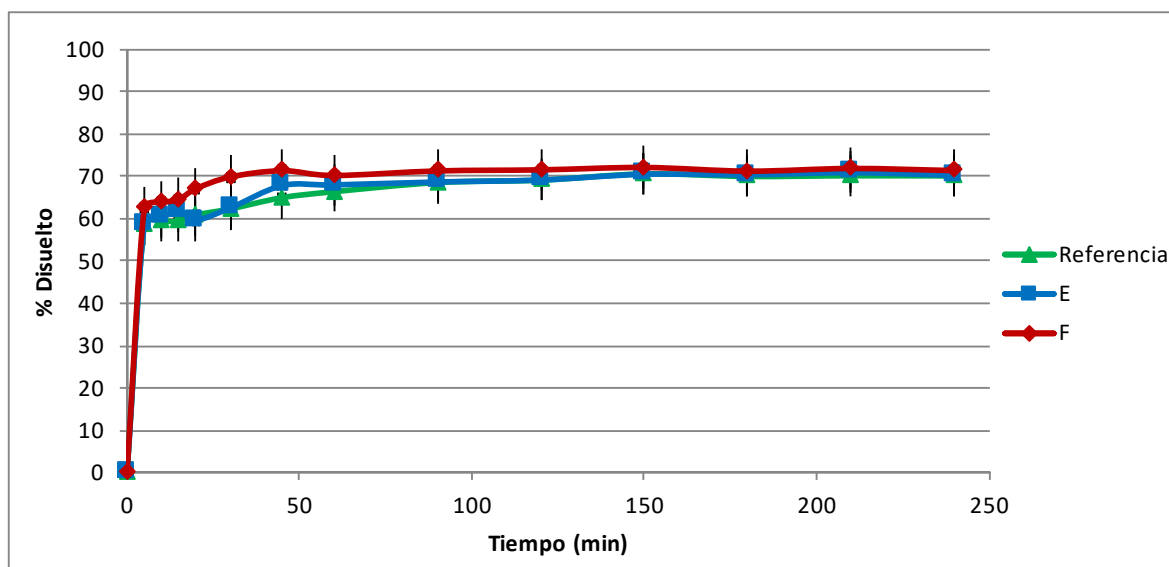
Tabla 136: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de Fosfato diácido de Potasio 50 mM con Tween 20 0,20%, empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 65: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio tampón pH 6,5 de Fosfato diácido de Potasio 50 mM con Tween 20 0,20% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,15%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	58,64 \pm 4,73	8,06	58,51 \pm 4,89	8,36	62,43 \pm 5,23	8,37
10	59,45 \pm 4,78	8,05	60,20 \pm 3,64	6,05	63,79 \pm 5,27	8,27
15	59,34 \pm 3,27	5,50	61,84 \pm 3,47	5,61	64,54 \pm 5,28	8,18
20	60,87 \pm 3,98	6,53	59,71 \pm 1,37	2,30	67,11 \pm 5,28	7,87
30	62,33 \pm 3,37	5,41	62,56 \pm 4,35	6,95	69,88 \pm 5,28	7,56
45	64,98 \pm 3,87	5,96	67,83 \pm 1,40	2,06	71,34 \pm 5,21	7,31
60	66,38 \pm 3,84	5,79	67,99 \pm 6,52	9,58	70,22 \pm 5,09	7,25
90	68,55 \pm 2,98	4,35	68,68 \pm 5,70	8,30	71,29 \pm 4,85	6,81
120	69,11 \pm 3,98	5,76	69,16 \pm 2,96	4,28	71,55 \pm 4,64	6,49
150	70,59 \pm 1,90	2,69	70,50 \pm 1,28	1,81	72,11 \pm 4,43	6,14
180	69,99 \pm 2,96	4,22	70,37 \pm 5,10	7,25	71,24 \pm 4,20	5,89
210	70,16 \pm 2,68	3,82	70,87 \pm 1,17	1,66	71,87 \pm 3,72	5,18
240	70,12 \pm 3,29	4,70	70,24 \pm 5,48	7,80	71,37 \pm 3,23	4,52

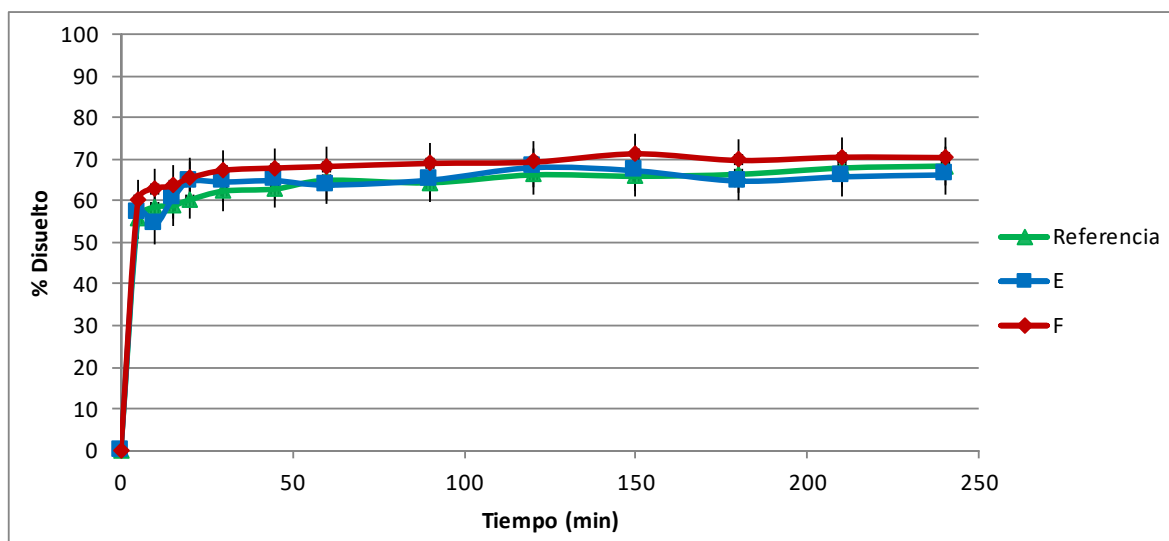
Tabla 137: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,15%, empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



Gráfica 66: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,15% (n=6)

pH 6,5 (tampón fosfato 50 mM) con Tween 20 0,10%. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	55,64 \pm 0,82	1,47	57,03 \pm 1,39	2,45	60,22 \pm 4,72	7,84
10	58,48 \pm 1,91	3,27	54,30 \pm 1,93	3,56	62,98 \pm 4,17	6,63
15	58,77 \pm 1,81	3,07	60,45 \pm 2,24	3,71	63,53 \pm 4,29	6,75
20	60,21 \pm 1,30	2,17	64,63 \pm 2,83	4,38	65,46 \pm 5,19	7,93
30	62,34 \pm 2,10	3,36	64,50 \pm 2,69	4,17	67,33 \pm 5,53	8,21
45	62,85 \pm 0,86	1,37	64,81 \pm 3,10	4,79	67,87 \pm 3,92	5,77
60	64,92 \pm 1,10	1,70	63,78 \pm 1,75	2,75	68,24 \pm 3,08	4,51
90	64,33 \pm 1,51	2,34	64,96 \pm 2,28	3,51	68,98 \pm 2,28	3,31
120	66,22 \pm 3,76	5,67	67,97 \pm 2,22	3,27	69,29 \pm 1,85	2,67
150	65,89 \pm 2,52	3,82	67,20 \pm 1,13	1,69	71,28 \pm 1,53	2,15
180	66,36 \pm 2,87	4,33	64,74 \pm 1,33	2,05	69,6 \pm 1,27	1,83
210	67,87 \pm 1,06	1,56	65,75 \pm 1,27	1,94	70,47 \pm 2,83	4,01
240	68,35 \pm 1,16	1,69	66,21 \pm 3,78	5,71	70,38 \pm 4,62	6,56

Tabla 138: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,10% empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)

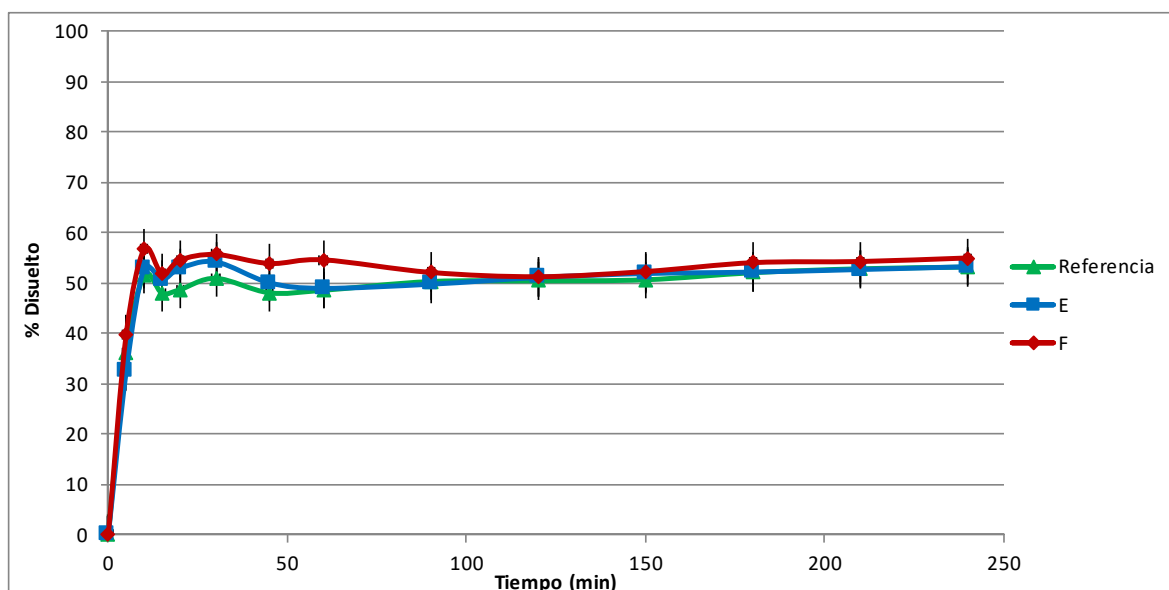


Gráfica 67: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio tampón pH 6,5 de fosfato diácido de potasio 50 mM con Tween 20 0,10% (n=6)

En la tabla N° 139 y la gráfica N° 68 se presentan los resultados del porcentaje disuelto de clonazepam en función del tiempo del producto de referencia y las formulaciones E y F en medio FaSSIF.

FaSSIF. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	36,23 \pm 3,03	8,36	32,52 \pm 3,11	9,55	39,92 \pm 3,64	9,12
10	51,54 \pm 2,61	5,07	52,92 \pm 4,04	7,64	56,74 \pm 3,22	5,68
15	48,04 \pm 1,87	3,89	50,72 \pm 2,66	5,24	51,86 \pm 3,73	7,18
20	48,74 \pm 1,73	3,55	52,96 \pm 2,10	3,97	54,61 \pm 4,02	7,35
30	50,98 \pm 1,03	2,02	54,24 \pm 2,03	3,74	55,72 \pm 2,90	5,20
45	48,10 \pm 1,41	2,92	50,10 \pm 2,20	4,40	53,93 \pm 2,84	5,27
60	48,61 \pm 1,40	2,88	49,00 \pm 2,48	5,05	54,65 \pm 3,11	5,68
90	50,35 \pm 3,38	6,71	49,81 \pm 2,30	4,61	52,15 \pm 4,70	9,01
120	50,48 \pm 4,01	7,94	51,15 \pm 1,66	3,24	51,30 \pm 4,40	8,58
150	50,69 \pm 3,27	6,45	51,93 \pm 2,48	4,77	52,34 \pm 3,92	7,50
180	52,10 \pm 2,73	5,24	52,22 \pm 2,57	4,93	54,09 \pm 3,44	6,36
210	52,88 \pm 1,61	3,04	52,73 \pm 1,38	2,61	54,32 \pm 2,01	3,69
240	53,22 \pm 3,26	6,13	53,28 \pm 3,88	7,28	55,03 \pm 1,81	3,29

Tabla 139: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio FaSSIF, empleando aparato II a 50 r.p.m. (n=6)



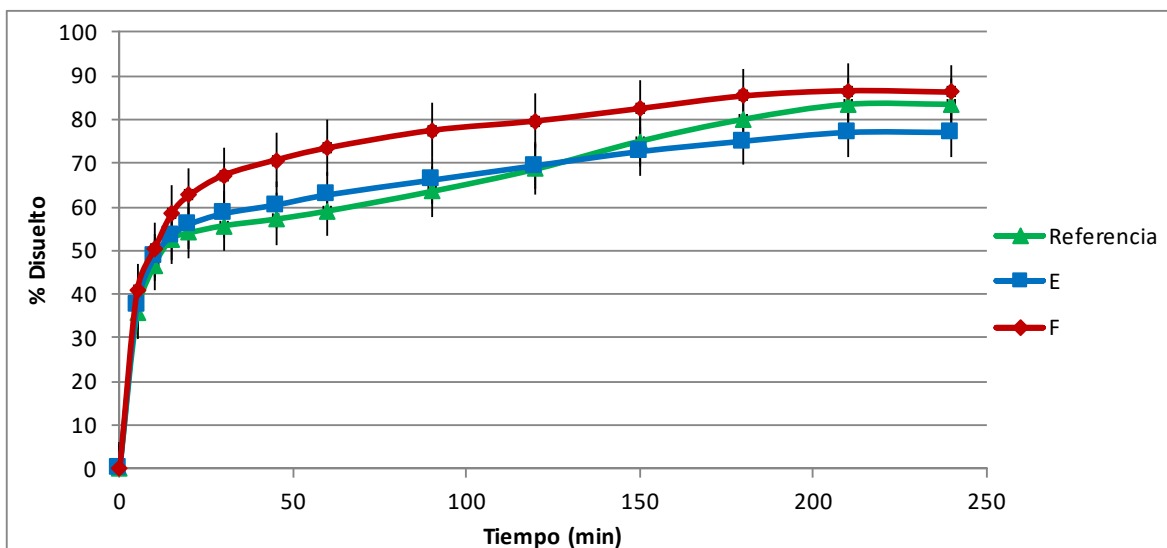
Gráfica 68: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio FaSSIF (n=6)

3.4.2. Aparato de disolución IV, celda de flujo

En la tabla N° 140 y gráfica N° 69 se presentan los porcentajes disueltos de lonazepam en función del tiempo del producto de referencia y las formulaciones E y F en los medios de disolución para bioexención pH 1,2+pH 4,5+pH 6,8 todos con Tween 20 0,20%. El cambio de pH 1,2 a pH 4,5 se realizó en el minuto 15 del ensayo y el cambio de pH 4,5 a pH 6,8 se realizó en el minuto 30 del ensayo. En la tabla N° 141 y gráfica N° 70 se muestran los resultados en los medios de disolución FaSSGF+FaSSIF. El cambio de medio se realizó en el minuto 15 del ensayo.

pH 1,2 50 mM + pH 4,5 36,5 mM + pH 6,8 50 mM todos con Tween 20 0,20 %. Aparato IV. 8 mL/min						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	35,62 \pm 0,25	0,71	37,49 \pm 1,37	3,65	40,72 \pm 2,44	5,99
10	46,67 \pm 0,03	0,06	48,53 \pm 1,45	2,98	50,24 \pm 3,18	6,33
15	52,63 \pm 0,15	0,28	53,38 \pm 1,18	2,21	58,46 \pm 3,19	5,46
20	54,02 \pm 0,04	0,08	55,95 \pm 2,94	5,26	62,61 \pm 2,14	3,42
30	55,67 \pm 0,03	0,06	58,44 \pm 3,47	5,93	67,24 \pm 2,22	3,30
45	57,17 \pm 1,87	3,28	60,40 \pm 4,03	6,66	70,69 \pm 3,14	4,43
60	59,04 \pm 2,90	4,91	62,72 \pm 5,30	8,45	73,48 \pm 4,04	5,50
90	63,51 \pm 3,67	5,78	66,08 \pm 6,49	9,83	77,47 \pm 6,07	7,83
120	68,61 \pm 0,17	0,24	69,40 \pm 5,55	7,99	79,62 \pm 5,03	6,31
150	374,98 \pm 1,36	1,82	72,61 \pm 4,70	6,48	82,47 \pm 4,13	5,01
180	80,01 \pm 1,73	2,16	74,99 \pm 5,70	7,60	85,35 \pm 3,04	3,56
210	83,43 \pm 1,63	1,95	76,99 \pm 2,70	3,51	86,54 \pm 4,04	4,67
240	83,43 \pm 1,81	2,17	76,99 \pm 4,70	6,11	86,22 \pm 3,13	3,63

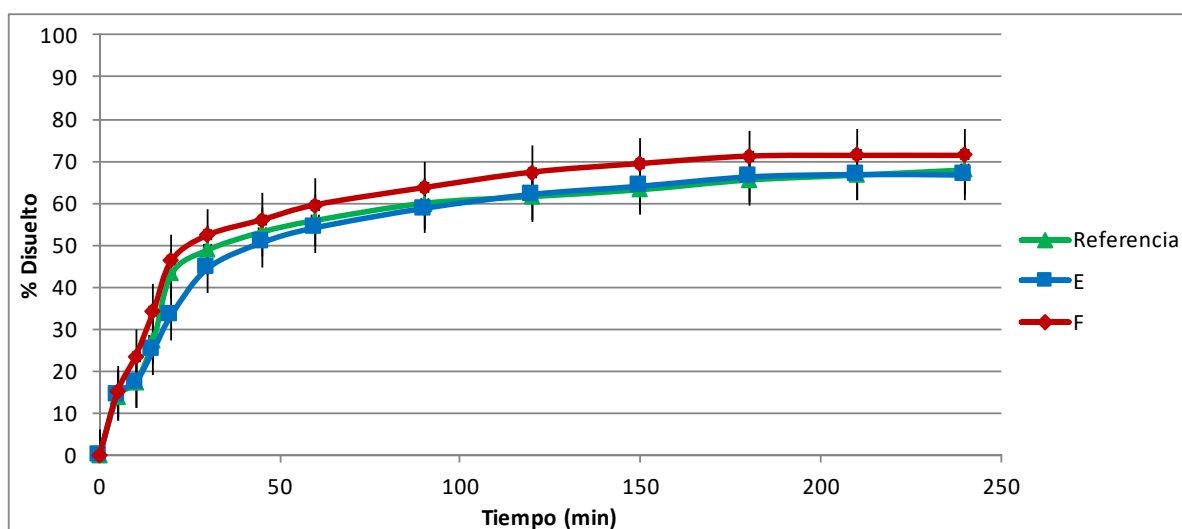
Tabla 140: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en medio pH 1,2 50 mM + pH 4,5 36,5 mM + pH 6,8 50 mM todos con Tween 20 0,20 %, empleando aparato IV a 8 mL/min (n=6)



Gráfica 69: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio pH 1,2 50 mM + pH 4,5 36,5 mM + pH 6,8 50 mM todos con Tween 20 0,20 % (n=6)

FaSSGF+FaSSIF. Aparato IV. 8 mL/min						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		E		F	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	14,02 \pm 0,61	4,35	4,39 \pm 1,15	7,98	15,20 \pm 1,21	7,94
10	17,22 \pm 0,80	4,64	17,31 \pm 1,59	9,19	23,58 \pm 0,77	3,26
15	27,48 \pm 0,68	2,46	25,15 \pm 0,72	2,85	34,43 \pm 1,49	4,33
20	43,20 \pm 0,20	0,47	33,49 \pm 1,05	3,15	46,42 \pm 0,96	2,08
30	48,85 \pm 0,67	1,36	44,47 \pm 0,63	1,42	52,41 \pm 2,27	4,34
45	53,11 \pm 0,63	1,18	50,58 \pm 1,40	2,77	56,04 \pm 1,30	2,31
60	55,90 \pm 0,33	0,58	54,17 \pm 1,71	3,16	59,63 \pm 2,23	3,74
90	59,96 \pm 0,66	1,10	58,76 \pm 2,29	3,90	63,70 \pm 3,37	5,28
120	61,57 \pm 0,24	0,38	62,09 \pm 1,43	2,31	67,39 \pm 1,42	2,10
150	63,19 \pm 1,37	2,16	64,03 \pm 1,36	2,12	69,43 \pm 1,73	1,73
180	65,50 \pm 1,06	1,62	66,23 \pm 2,99	4,52	71,18 \pm 2,02	2,02
210	66,65 \pm 2,19	2,19	66,80 \pm 2,03	3,04	71,37 \pm 3,04	3,04
240	67,89 \pm 1,04	1,04	66,67 \pm 3,53	5,29	71,37 \pm 4,07	4,07

Tabla 141: Porcentajes disueltos de clonazepam en función del tiempo en FaSSGF+FaSSIF, empleando aparato IV a 8 mL/min (n=6)



Gráfica 70: Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones E y F de clonazepam en medio FaSSGF+FaSSIF (n=6)

3.5. Comparación de las cinéticas de disolución con factor de similitud f_2

3.5.1. Factor de similitud f_2 . Aparato II. 50 r.p.m.

En la tabla N° 142 se muestran los factores de similitud f_2 entre el producto referencia de clonazepam y los productos en estudio del mismo fármaco E y F en los medios ensayados en el aparato II a 50 r.p.m.

Medios	E	F
pH 1,2 50 mM	99,3	99,1
pH 4,5 36,5 mM	79,6	68,1
pH 6,8 50 mM	69,2	72,9
pH 6,8 10 mM	79,2	73,2
LSS 0,1%	75,0	74,2
LSS 1%	85,0	73,1
Tween 20 0,10%	80,1	68,0
Tween 20 0,15%	90,2	69,8
Tween 20 0,20%	83,9	71,5
Tween 20 0,30%	N/A	N/A
FaSSIF	81,6	69,7

Tabla 142: Factor de similitud f_2 entre el producto de referencia y las formulaciones en estudio E y F de clonazepam en aparato II a 50 r.p.m. (N/A: no aplica)

3.5.2. Factor de similitud f_2 . Aparato IV. 8 mL/min

En la tabla N° 143 se presentan los factores de similitud f_2 entre el producto referencia de clonazepam y los productos en estudio del mismo fármaco E y F en los medios ensayados en el aparato IV a 8 mL/min

f_2	E	F
pH 1.2 50 mM + pH 4.5 36.5 mM + pH 6.8 50 mM todos con Tween 20 0.20 %.	71,7	49,9
FaSSGF+FaSSIF	81,6	69,7

Tabla 143: Factor de similitud f_2 entre el producto de referencia y las formulaciones en estudio E y F de clonazepam en aparato IV a 8 mL/min

3.6. Ensayos *in situ* para determinar el efecto de la formulación de sobre la permeabilidad del clonazepam

En las tablas de la N° 144 a la 146 que se muestran a continuación, se presentan los resultados de los experimentos realizados *in situ* con soluciones preparadas de las tres formulaciones de clonazepam. En la gráfica N° 71 se representa la comparativa de las constantes de absorción de las formulaciones en estudio de clonazepam (Referencia, E y F). En la gráfica N° 72 se muestran la comparación de la constante de absorción de clonazepam como patrón (tabla N° 151) con las constantes de absorción de las soluciones preparadas a partir del producto de referencia de clonazepam y las formulaciones E y F.

Concentración remanente de clonazepam en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 4 µg/mL (Referencia) Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	3,19	3,09	3,39	3,17	3,21	0,13
10	3,01	2,84	3,22	2,90	2,99	0,17
15	2,73	2,37	3,00	2,68	2,70	0,26
20	2,35	1,88	2,77	2,30	2,33	0,36
25	1,90	1,53	2,29	1,93	1,91	0,31
30	1,77	1,28	2,02	1,37	1,61	0,35
Vr(mL)	8,0	6,5	6,5	5,5	6,63	1,03
Ajuste no lineal						
Ka(h ⁻¹)	1,46	2,11	1,18	1,69	1,61	0,39
A ₀ (µg/mL)	3,74	3,84	3,87	3,81	3,82	0,06

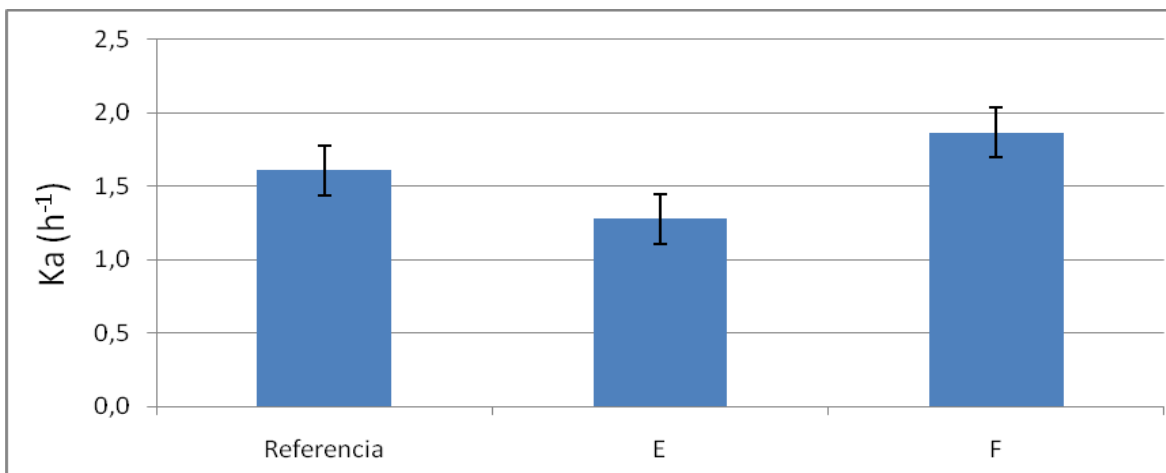
Tabla 144: Concentración de clonazepam remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de clonazepam a una concentración de 4 µg/mL preparada a partir del producto de Referencia

Concentración remanente de clonazepam en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 4 µg/mL (E) Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	3,22	3,27	3,31	3,43	3,31	0,09
10	2,78	3,17	3,24	3,18	3,09	0,21
15	2,55	2,60	3,07	2,81	2,76	0,24
20	2,37	2,41	2,54	2,66	2,50	0,13
25	1,84	1,95	2,43	2,55	2,19	0,35
30	1,33	1,92	2,42	2,17	1,96	0,47
Vr(mL)	5,2	6,8	7,5	6,0	6,38	0,99
Ajuste no lineal						
Ka(h ⁻¹)	1,76	1,43	0,90	1,02	1,28	0,39
A ₀ (µg/mL)	3,81	3,79	3,65	3,74	3,75	0,07

Tabla 145: Concentración de clonazepam remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de clonazepam a una concentración de 4 µg/mL preparada a partir del producto E

Concentración remanente de clonazepam en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 4 µg/mL (F) Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	3,34	3,26	2,28	2,56	2,86	0,52
10	2,69	2,97	2,03	2,20	2,47	0,43
15	2,42	2,69	1,74	1,95	2,20	0,43
20	2,20	2,07	1,29	1,75	1,83	0,41
25	1,98	1,81	0,98	1,52	1,57	0,44
30	1,74	1,55	0,80	1,17	1,32	0,42
Vr(mL)	7,5	4,5	4,5	8,5	6,25	2,06
Ajuste no lineal						
Ka(h ⁻¹)	1,53	1,80	2,44	1,69	1,87	0,40
A ₀ (µg/mL)	3,65	3,92	2,92	2,96	3,36	0,50

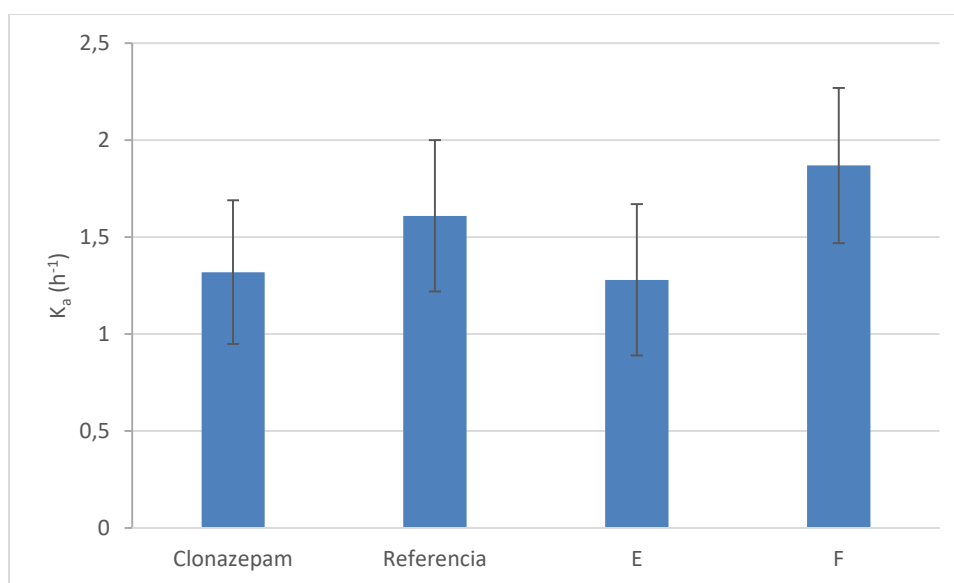
Tabla 146: Concentración de clonazepam remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de clonazepam a una concentración de 4 µg/mL preparada a partir del producto F



Gráfica 71: Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de las formulaciones en estudio de clonazepam (Referencia, E y F)

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	0,030	0,971	NS
ANOVA		0,164	NS

Tabla 147: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a las constantes de absorción en el modelo in situ de de las formulaciones en estudio de clonazepam (Referencia, E y F)



Gráfica 72: Comparación de las constantes de absorción en el modelo in situ de clonazepam y las formulaciones Referencia, E y F

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	0,994	0,026	NS
ANOVA		0,149	NS

Tabla 148: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a las constantes de absorción en el modelo in situ de clonazepam y las formulaciones Referencia, E y F

3.7. Ensayos *in situ* para determinar el efecto de los excipientes sobre la permeabilidad

los resultados de los experimentos individuales realizados *in situ* con soluciones de clonazepam y soluciones del fármaco con los diferentes excipientes estudiados, se muestran en las tablas que se muestran a continuación. En la gráfica N° 73 se representan las constantes de absorción de la sustancia activa y con excipientes

Concentración remanente de clonazepam en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: 4 µg/mL Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	0,79	0,92	1,54	0,95	1,28	1,10	0,31
10	0,68	0,90	1,42	1,01	1,30	1,06	0,30
15	0,61	0,80	1,33	0,92	1,14	0,96	0,28
20	0,50	0,68	1,15	0,76	1,07	0,83	0,27
25	0,42	0,66	0,95	0,73	0,92	0,74	0,21
30	0,35	0,62	0,78	0,69	0,72	0,63	0,17
Vr(mL)	5,5	5,5	7	6	7,5	6,30	0,91
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,86	1,06	1,49	0,94	1,24	1,32	0,37
A ₀ (µg/mL)	0,93	1,03	1,81	1,10	1,52	1,28	0,37

Tabla 149: Concentración de clonazepam remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de clonazepam a una concentración de 4 µg/mL

Concentración remanente de clonazepam en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: clonazepam (4 µg/mL)+lactosa (0,68 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	0,95	1,32	1,60	1,80	1,52	1,44	0,32
10	0,92	1,15	1,46	1,56	1,34	1,29	0,26
15	0,76	0,96	1,28	1,49	1,24	1,15	0,29
20	0,71	0,88	1,16	1,32	1,21	1,06	0,25
25	0,55	0,68	1,11	1,33	1,08	0,95	0,32
30	0,50	0,55	0,90	1,16	1,02	0,83	0,29
Vr(mL)	4,8	4,2	6	6,5	7	5,70	1,17
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,56	1,96	1,28	0,99	0,93	1,34	0,43
A ₀ (µg/mL)	1,13	1,58	1,79	1,91	1,61	1,60	0,30

Tabla 150: Concentración de clonazepam remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de clonazepam a una concentración de 4 µg/mL en presencia de lactosa a concentración de 0,68 mg/mL

Concentración remanente de clonazepam en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: clonazepam (4 µg/mL)+almidón (0,08 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	2,49	1,02	2,04	1,99	2,28	1,96	0,56
10	2,50	0,96	1,94	1,66	2,23	1,86	0,59
15	2,30	0,79	1,69	1,46	2,04	1,66	0,58
20	2,22	0,80	1,49	1,24	1,85	1,52	0,55
25	2,05	0,64	1,22	1,11	1,72	1,35	0,55
30	1,88	0,58	1,15	1,02	1,46	1,22	0,49
Vr(mL)	6	4,8	4	4,5	4,5	4,76	0,75
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,16	1,69	1,01	0,68	1,34	1,18	0,38
A ₀ (µg/mL)	2,72	1,16	2,34	2,24	2,57	2,21	0,61

Tabla 151: Concentración de clonazepam remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de clonazepam a una concentración de 4 µg/mL en presencia de almidón a concentración de 0,08 mg/mL

Concentración remanente de clonazepam en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: clonazepam (4 µg/mL)+estearato de magnesio (0,006 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	2,41	1,63	2,59	1,46	1,44	1,91	0,55
10	2,39	1,59	2,45	1,51	1,10	1,81	0,59
15	2,22	1,42	2,18	1,27	0,93	1,60	0,57
20	1,86	1,36	1,83	1,22	0,87	1,43	0,42
25	1,67	1,30	1,63	1,21	0,79	1,32	0,36
30	1,66	1,21	1,60	1,18	0,79	1,29	0,35
Vr(mL)	8,5	7	7	8	7,5	7,60	0,65
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,05	0,74	1,60	1,31	0,63	1,07	0,40
A ₀ (µg/mL)	2,73	1,75	2,95	1,57	1,53	2,11	0,68

Tabla 152: Concentración de clonazepam remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de clonazepam a una concentración de 4 µg/mL en presencia de estearato de magnesio a concentración de 0,006 mg/mL

Concentración remanente de clonazepam en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: clonazepam (4 µg/mL)+talco (0,008 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	3,15	1,76	1,28	3,21	1,34	2,15	0,96
10	3,10	1,50	1,21	3,09	1,29	2,04	0,97
15	2,89	1,35	1,17	2,76	1,21	1,88	0,87
20	2,27	1,20	1,11	2,42	1,13	1,63	0,66
25	2,13	1,24	0,99	2,15	0,97	1,50	0,60
30	2,15	1,17	0,78	2,01	0,75	1,37	0,67
Vr(mL)	7	7,5	4,8	5,8	4	5,82	1,46
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,12	1,02	0,98	1,20	1,18	1,10	0,10
A ₀ (µg/mL)	3,58	1,82	1,44	3,64	1,55	2,41	1,11

Tabla 153: Concentración de clonazepam remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de clonazepam a una concentración de 4 µg/mL en presencia de talco a concentración de 0,008 mg/mL

Concentración remanente de clonazepam en lumen intestinal Concentración inicial perfundida: clonazepam (4 µg/mL)+povidona (0,02 mg/mL) Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	1,79	3,59	2,62	3,73	2,54	2,85	0,81
10	1,54	3,42	2,19	3,61	2,18	2,59	0,89
15	1,44	3,26	2,19	3,28	2,14	2,46	0,79
20	1,27	3,24	2,02	3,28	2,02	2,37	0,87
25	1,26	3,01	2,04	3,10	2,15	2,31	0,76
30	1,08	2,56	1,71	2,71	1,76	1,96	0,67
Vr(mL)	5,5	4	6	4,5	6,5	5,30	1,04
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,14	0,67	0,83	0,68	0,67	0,80	0,20
A ₀ (µg/mL)	1,92	3,85	2,70	3,99	2,58	3,01	0,89

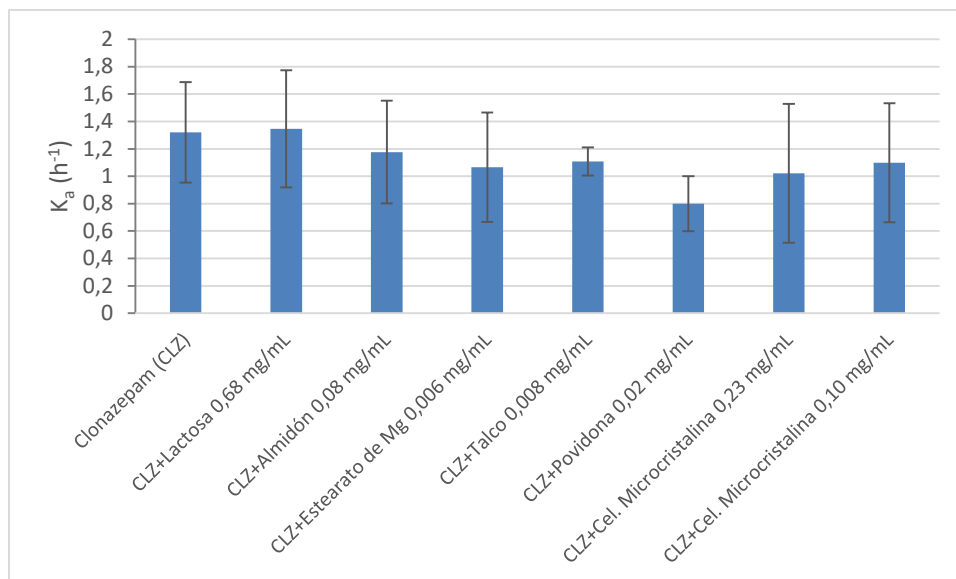
Tabla 154: Concentración de clonazepam remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de clonazepam a una concentración de 4 µg/mL en presencia de povidona a concentración de 0,02 mg/mL

Concentración remanente de clonazepam en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: clonazepam (4 µg/mL)+celulosa microcristalina (0,23 mg/mL)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	0,81	1,53	2,69	1,89	1,58	1,70	0,68
10	0,67	1,52	2,59	1,75	1,46	1,60	0,69
15	0,49	1,23	2,53	1,63	1,22	1,42	0,74
20	0,47	1,23	2,49	1,50	1,21	1,38	0,73
25	0,45	1,02	2,34	1,47	1,20	1,30	0,69
30	0,42	0,91	2,14	1,38	1,14	1,20	0,63
Vr(mL)	7	4,5	7,5	6,5	5	6,10	1,29
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,78	1,26	0,48	0,76	0,82	1,02	0,51
A ₀ (µg/mL)	0,89	1,76	2,83	1,99	1,64	1,82	0,70

Tabla 155: Concentración de clonazepam remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de clonazepam a una concentración de 4 µg/mL en presencia de celulosa microcristalina a concentración de 0,23 mg/mL

Concentración remanente de clonazepam en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: clonazepam (4 µg/mL)+celulosa microcristalina (0,10 mg/mL)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	1,34	1,38	2,27	1,47	2,27	1,75	0,48
10	1,07	1,23	1,99	1,09	2,01	1,48	0,48
15	0,79	1,17	1,75	0,98	1,83	1,30	0,46
20	0,78	1,14	1,65	0,93	1,79	1,26	0,44
25	0,78	1,14	1,51	0,94	1,58	1,19	0,35
30	0,72	1,15	1,46	0,93	1,28	1,11	0,29
Vr(mL)	7,5	5	6	4,5	4	5,40	1,39
Ajuste no lineal							
Ka(h ⁻¹)	1,64	0,42	1,11	1,12	1,20	1,10	0,44
A ₀ (µg/mL)	1,43	1,36	2,42	1,45	2,50	1,83	0,57

Tabla 156: Concentración de clonazepam remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenida tras la perfusión de una solución de clonazepam a una concentración de 4 µg/mL en presencia de celulosa microcristalina a concentración de 0,10 mg/mL



Gráfica 73: Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de clonazepam y los excipientes de las formulaciones en estudio (Referencia, E y F)

Pruebas Estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	Sig.	
	1,237	0,312	NS
ANOVA		0,404	NS

Tabla 157: Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a las constantes de absorción en el modelo in situ de clonazepam y los excipientes de las formulaciones en estudio (Referencia, E y F)

Capítulo V: Discusión

1. Fármacos estudiados

En los últimos años se está trabajando enormemente en el desarrollo de modelos para predecir comportamiento *in vivo* de fármacos y formulaciones. Los estudios *in vitro* con sustentada capacidad predictiva son una herramienta de gran utilidad que minimizan los costos asociados al desarrollo de formulaciones y tienen un impacto positivo desde el punto de vista ético ya que disminuyen los estudios en humanos.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, propuesto por Gordon Amidon, estableció un marco científico que permite estructurar de forma adecuada los posibles modelos predictivos que resultarán útiles para cada clase de sustancia activa. Así, este Sistema clasifica los fármacos en función de su solubilidad acuosa y su permeabilidad que son los factores que determinan, junto con la velocidad de disolución, el proceso de absorción de una sustancia administrada por vía oral. Para los fármacos de las clases I y III (alta solubilidad) los estudios de disolución *in vitro* son suficientes para establecer intercambiabilidad entre dos formulaciones. En el caso de las sustancias activas que se clasifican como de baja solubilidad y alta permeabilidad (clase II), al ser la disolución la limitante del proceso de absorción, se pueden establecer correlaciones *In Vitro-In Vivo* que optimizan los cambios post-registro o el proceso de escalado industrial ya que permiten asegurar que el desempeño *in vivo* de la formulación es el adecuado sin necesidad de recurrir a estudios en humanos.

Esta investigación persigue diseñar modelos *in vitro* predictivos del comportamiento *in vivo* de formulaciones que contienen fármacos de la clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico y con ello poder predecir el desempeño en humanos de formulaciones que contienen los fármacos estudiados.

En una cooperación entre la Agencia Española de Medicamentos y la Universidad Miguel Hernández se sugirió que se estudiaran formulaciones que contienen candesartán cilexetilo y valsartán de las que se contaba con datos de estudios de bioequivalencia en humanos. Otra cooperación similar con el Instituto de Salud Pública de Chile procuró el estudio de formulaciones que contienen clonazepam. Estos fármacos fueron seleccionados por estar clasificados en forma preliminar como clase II en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico y por disponer de datos de estudios de bioequivalencia fallidos, además de contar con el apoyo de las empresas de genéricos que pusieron a muestras disposición las formulaciones que arrojaron tales resultados en los estudios de bioequivalencia.

En las tablas N° 158, 159 y 160 se muestran los resultados de los estudios de bioequivalencia de los lotes estudiados de candesartán cilexetilo, valsartán y clonazepam, respectivamente. En ellas se presentan los ratios (test/referencia) de las concentraciones máximas alcanzadas en plasma (C_{\max}), las áreas bajo la curva (ABC) y sus respectivos intervalos de confianza (IC) del 90%. Para evaluar la bioequivalencia, los ratios de C_{\max} y ABC deben ser mayores que 85% en ambos casos y los IC deben estar comprendidos entre el 80 y 125% para que los lotes se consideren bioequivalentes.

Formulación	Bioequivalente en estudios en humanos	C _{max}		ABC	
		Ratio (%)	IC (%)	Ratio (%)	IC (%)
A	SI Bioequivalente bajo	86,16	83,09-93,53	87,68	83,86-91,67
B	SI Bioequivalente bajo	89,10	84,32-94,14	92,69	89,06-96,46

Tabla 158: Resultados de los estudios de bioequivalencia in vivo de las formulaciones de candesartán cilexetilo

En la tabla 158 se puede observar que para las formulaciones A y B de candesartán cilexetilo los IC% están dentro de los límites (0,8-1,25), sin embargo, se trata de bioequivalentes bajos, ya que los intervalos de confianza no incluyen el 100%.

Valsartán					
Formulación	Bioequivalente en estudios en humanos	C _{max}		ABC	
		Ratio (%)	IC (%)	Ratio (%)	IC (%)
C	SI	98,02	87,74-109,50	106,64	97,29-116,90
D	NO	122,89	107,60-140,34	113,71	102,26-126,45

Tabla 159: Datos de los estudios de bioequivalencia in vivo de las formulaciones de valsartán

De las dos formulaciones de valsartán estudiadas, tal como se puede apreciar en la tabla 159, la formulación C es bioequivalente y la D no es bioequivalente, ya que presenta %IC para C_{max} y ABC por encima de 125, es decir, tienen una mayor biodisponibilidad que el producto de referencia.

Clonazepam

Formulación	Bioequivalente en estudios en humanos	C _{max}		AUC	
		Ratio (%)	IC (%)	Ratio (%)	IC (%)
E	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos
F	No	130,28	117,44-144,52	103,03	97,86-108,48

Tabla 160: Datos de los estudios de bioequivalencia in vivo de las formulaciones de clonazepam

En la tabla 160 se observan los datos del estudio de bioequivalencia de la formulación F de clonazepam. Esta formulación presenta %IC para C_{max} por encima de 125 y por ende no es bioequivalente con respecto al producto de referencia. La formulación E corresponde a la formulación de 0,5 mg de clonazepam elaborada por el laboratorio fabricante del producto de referencia de 1 mg y por tanto, por proporcionalidad de la formulación, debería tener una biodisponibilidad similar a la formulación de referencia siempre que se use igualdad de dosis. Por ello, en el presente estudio, de la formulación E siempre se usaron dos comprimidos (que contenían 0,5 mg del principio activo por comprimido) para comparar con un comprimido del producto de referencia que contiene 1 mg de clonazepam; esto con la finalidad de corroborar similitud en el comportamiento in vitro de una formulación de menor dosis pero que tiene proporcionalidad en la composición con respecto al producto de referencia tanto de activo como de excipientes. Este procedimiento está establecido por las agencias regulatorias en materia de medicamentos, para igualar la cantidad de principio activo cuando el producto de referencia disponible es de mayor dosis que la formulación a estudiar.

2. Métodos de cuantificación de muestras

La valoración de las muestras obtenidas en cada uno de los ensayos realizados se hizo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Todos los métodos analíticos fueron validados evaluando su linealidad, exactitud, precisión, estabilidad, influencia del filtro, especificidad, robustez, límite de detección y límite de cuantificación.

Para realizar la detección se empleó, tal como se describió anteriormente en forma detallada, el detector de fluorescencia para cuantificar candesartán cilexetilo y valsartán (con longitudes de excitación y emisión de 250 y 375 nm, respectivamente, para ambos compuestos) y el detector UV a 254 nm para clonazepam.

En las tablas de la 16 a la 21 se muestran los resultados de la validación del método para cuantificar candesartán cilexetilo. La validación del método analítico para cuantificar valsartán se muestra en las tablas de la 69 a la 74. Para el clonazepam, los resultados de la validación se muestran en las tablas de la 115 a la 120.

Como se puede observar en las tablas antes mencionadas, los métodos desarrollados para cuantificar candesartán cilexetilo, valsartán y clonazepam cumplieron con los criterios establecidos para afirmar que son métodos con tendencia lineal en los intervalos estudiados, son exactos, precisos, específicos, robustos. Las muestras se mantienen estables durante el período que dura el ensayo tanto en condiciones ambientales como de refrigeración. Se demostró además que la filtración no genera cambios significativos en la cantidad de principio activo y por tanto no afecta los resultados obtenidos.

Las concentraciones de todas las muestras analizadas estaban, en todos los casos, por encima de los límites de detección para cada método y dentro de las rectas de calibración preparadas a diario para realizar los análisis correspondientes.

3. Diseño de estudios

Los principios activos estudiados se comercializan desde hace años en el mercado mundial y por tanto se dispone de información sobre sus características fisicoquímicas y de su farmacocinética.

a) Estudios para establecer la solubilidad de los fármacos

Con la finalidad de confirmar la clasificación de los fármacos estudiados como de baja solubilidad, se cuantificó ésta siguiendo la técnica de determinación de la concentración de saturación. Se emplearon, además de los medios tamponados usuales, los medios biopredictivos para establecer de este modo si la solubilidad de los fármacos mejora por el efecto de los tensoactivos. Se estudió la solubilidad del fármaco a fin de calcular el número de dosis y además se empleó la misma técnica de concentración de saturación para estudiar el efecto de los excipientes y la formulación sobre la solubilidad de los principios activos.

b) Ensayo de disgregación

El ensayo de disgregación es un estudio *in vitro* descrito en las farmacopeas que permite definir el tiempo que tarda una formulación en disgregarse. La disgregación es el paso previo a la disolución del principio activo cuando se administra a un paciente una forma farmacéutica sólida. Por ello si el ensayo *in vitro* en el medio acuoso correspondiente permite encontrar alguna relación predictiva del comportamiento *in vivo* es de gran utilidad ya que se trata de una prueba económica, sencilla y rápida ⁽¹⁴⁰⁾.

c) Estudios de velocidad de disolución

Los estudios de velocidad de disolución se realizaron en los aparatos II (paletas) y IV (celda de flujo) descritos en la EP. El aparato II es el más frecuentemente usado en la industria farmacéutica y por ello se empleó para realizar los estudios de disolución. Por su parte, el aparato IV ha demostrado ser útil para establecer CIVIV ⁽¹⁴¹⁾. Los estudios de velocidad de disolución evaluaron el comportamiento de las formulaciones en los medios descritos en la EP, en medios diseñados a diferentes pH y con tensoactivos (LSS y Tween 20), además de en los medios biopredictivos comerciales FaSSGF y FaSSIF. Estos estudios perseguían encontrar las condiciones de ensayo *in vitro* que se correlacionaran con los datos de concentración plasmática obtenidos en los ensayos *in vivo*.

Para establecer si dos formulaciones tienen el mismo desempeño en cuanto a su capacidad para ceder el principio activo desde la formulación, se deben comparar los perfiles de

disolución o curvas de cantidad disuelta en función del tiempo. La comparación entre dos perfiles de disolución se realizó con el cálculo del factor de similitud, f_2 . Un factor de similitud igual o mayor que 50 permitió establecer que dos perfiles eran similares.

d) Estudio de permeabilidad *in situ*

La constante aparente de velocidad de absorción es un parámetro que puede emplearse para representar el proceso de absorción puesto que es un índice de la velocidad de absorción del soluto. El modelo usado en la presente tesis es el descrito por Doluisio y colaboradores y permitió la determinación de la constante aparente de velocidad de absorción. Se seleccionó este método *in situ* porque reproduce con mayor fiabilidad que los modelos *in vitro* la realidad fisiológica del proceso de absorción *in vivo*, manteniendo condiciones fisiológicas de flujo sanguíneo e integridad de la mucosa intestinal. Otra ventaja que presenta el modelo empleado es que la muestra perfundida permanece durante todo el ensayo en contacto con la mucosa intestinal lo que asegura mayor absorción que otros métodos en los que el contacto de la muestra con el tejido intestinal es intermitente.

El proceso de absorción de los fármacos en el tracto gastrointestinal ocurre de forma paralela al proceso de reabsorción de agua. El proceso de absorción de agua se realiza según una cinética de orden cero y es necesario considerar este proceso debido a que el volumen de agua reabsorbido falsea las concentraciones del fármaco, ya que las muestras estarán más concentradas que si no se produjera la reabsorción de agua. Esto es más crítico en las últimas muestras tomadas, y si no se realiza la corrección necesaria la constante de velocidad de absorción será errónea por defecto. Para evitar este error en la constante se corrigió individualmente la concentración de cada muestra en función del volumen de líquido remanente ⁽¹⁴²⁾.

El modelo empleado permite obtener constantes de velocidad de absorción sin las limitantes que pueden presentarse por disolución u otros factores biológicos o

fisicoquímicos como ocurren en los modelos *in vivo*. Por otro lado, en este modelo es posible estudiar muestras con múltiples características físicas como las derivadas de los estudios para evaluar el efecto de los excipientes o la formulación sobre la absorción de los fármacos estudiados. La mayoría de mezclas preparadas eran dispersiones (por contener sólidos insolubles), que no pueden ensayarse en el modelo *in vitro* porque puede provocar ruptura de la membrana, lo que supone que los resultados obtenidos con este último método son erróneos.

4. Interpretación de resultados

4.1. Candesartán cilexetilo

a) Concentración de saturación

Los resultados obtenidos en el estudio de solubilidad de candesartán cilexetilo se muestran en la tabla 22 y la representación gráfica del perfil solubilidad-pH se puede ver en la gráfica 2. En la representación gráfica se puede apreciar el comportamiento de un ácido débil. Candesartán cilexetilo es un fármaco con un número de dosis superior a la unidad en los pHs representativos del tracto gastrointestinal y por tanto los resultados confirman que se clasifica como un fármaco de baja solubilidad. La solubilidad en condiciones de saturación a pH 6,8 resultó mayor que el reportado por Gurunath y colaboradores ($4,56 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$), sin embargo, en ambas investigaciones el fármaco se considera de baja solubilidad según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico ⁽¹⁴³⁾.

La concentración de saturación de candesartán cilexetilo en los medios biopredictivos comerciales FaSSGF y FaSSIF (tabla 23) conducen a un número de dosis mayor que uno, e incluso son mayores a los obtenidos a pH 4,5 y 6,8 con los medios de farmacopea, por lo que el efecto micelar, que se espera de los tensoactivos contenidos en los medios biopredictivos usados, no aumentan la solubilidad de candesartán cilexetilo.

Recientemente se han propuesto modificaciones del medio FaSSIF (V3), que presenta variaciones con respecto al empleado en esta Tesis. El medio FaSSIF empleado en la presente investigación contiene taurocolato de sodio y lecitina mientras que el medio FaSSIF-V3 contiene glicolato, taurocolato, colesterol, lisolecitina y oleato de sodio. Los estudios de disolución de diez fármacos modelo de diferente naturaleza en este nuevo medio demostraron que la cantidad y tipo de fosfolípidos empleados en los medios biopredictivos tienen impacto sobre la solubilidad y la tensión superficial de los medios, lo que tiene efecto sobre la solubilidad de los fármacos estudiados. Resultaría conveniente realizar nuevos estudios sobre la solubilidad de candesartán cilexetilo empleando esta nueva generación de medios que reflejan mejor la solubilidad de los fármacos en los fluidos intestinales humanos ⁽¹⁴⁴⁾.

Además de emplear los diversos tampones se determinó la concentración de saturación de candesartán cilexetilo en agua, con la finalidad de comparar tal concentración con la obtenida para el principio activo en presencia de excipientes que forman parte de las formulaciones objeto de estudio. Como se puede observar en la tabla 24 y la gráfica 3, la concentración de saturación del principio activo disminuye en presencia de los excipientes estudiados y según la prueba de comparación múltiple de Scheffe esta diferencia es estadísticamente significativa (tablas 25 y 26). Siendo candesartán cilexetilo un fármaco poco soluble, la disminución de solvente disponible por presencia de los excipientes podría ser la causa de la disminución de solubilidad. Este efecto podría alterar la absorción, ya que para los fármacos de baja solubilidad el paso limitante para la absorción puede llegar a ser la disolución y ésta depende de la solubilidad.

En la determinación de la concentración de saturación desde las formulaciones estudiadas de candesartán cilexetilo (tabla 27 y gráfica 4) se observó que el producto de referencia presenta una solubilidad mayor del principio activo que la caracterizada desde las formulaciones A y B; en consecuencia, el número de dosis del producto de referencia es menor que el de las formulaciones A y B con una relación prácticamente tres veces menor.

Esta diferencia es estadísticamente significativa según el resultado que muestra la prueba de comparación múltiple de Scheffe (tablas 28 y 29). Es bien conocido que los excipientes pueden influir en la solubilidad de fármacos contenidos en formas farmacéuticas sólidas ⁽¹⁴⁵⁾. Los resultados de solubilidad obtenidos para las formulaciones estudiadas de candesartán cilexetilo reflejan en cierta medida los resultados obtenidos en los ensayos de bioequivalencia, el producto de referencia presenta una mayor solubilidad del fármaco que las otras formulaciones analizadas y esto se corresponde con una mayor absorción, aunque bien es verdad que las diferencias en absorción no son de gran relevancia y las formulaciones A y B son bioequivalentes a la formulación de referencia. Esto ratifica lo que se ha venido observando en estudios previos en los que se ha demostrado que los excipientes pueden influir sobre la biodisponibilidad de fármacos ⁽²⁷⁾.

b) Ensayo de disgregación

Los resultados del ensayo de disgregación para el producto de referencia y para las formulaciones A y B se muestran en la tabla 30. El ensayo de disgregación solo permite verificar que la forma farmacéutica se disgrega en un medio acuoso sin que esto implique disolución del fármaco. La disgregación está determinada por la fuerza de compresión y la cantidad de disgregantes. Los disgregantes actúan generalmente captando agua y de esta forma se hinchan y con ello rompen rápida y eficazmente los comprimidos ⁽¹⁴⁶⁾, lo que no garantiza, no obstante, una disolución del principio activo en el medio. De hecho, los resultados de los ensayos de disgregación de candesartan puede considerarse que no son representativos de los obtenidos *in vivo*: el tiempo de disgregación del producto de referencia y la formulación B es similar, mientras que la formulación A presenta un tiempo de disgregación menor que el del producto de referencia, que no se corresponde con una absorción más temprana. Este menor tiempo de disgregación de la formulación A puede deberse a que posea una cantidad mayor de disgregante o a una fuerza de compresión menor, que permite la incorporación de solvente en el comprimido y promueve por tanto una rápida disgregación.

c) Perfiles de disolución

Los perfiles de disolución realizados en los medios con pH característicos del tracto gastrointestinal y descritos en la EP (pH 1,2; 4,5 y 6,8) en el aparato II se pueden observar en las gráficas 5, 6 y 7; y los datos en las tablas 31, 32 y 33. A pH 1,2 la cantidad disuelta es muy baja, no superando en ningún caso el 1,4%, lo que es de esperar para un ácido débil como candesartán cilexetilo y no existen diferencias de importancia en los perfiles de las tres formulaciones estudiadas. A pH 4,5 el porcentaje disuelto está por debajo del 6% y aunque la formulación B presenta un porcentaje disuelto ligeramente superior al producto de referencia y a la formulación A, esta diferencia carece de carácter predictivo. A pH 6,8 el producto de referencia y la formulación A presentan porcentajes disueltos similares y la formulación B presenta un porcentaje disuelto superior, pero esta diferencia no se asemeja a lo obtenido en el estudio de bioequivalencia, en el que por el contrario, la formulación B presenta menor biodisponibilidad que el producto de referencia. En estos perfiles, la solubilidad de candesartán cilexetilo es muy baja para todas las formulaciones y en ningún perfil se muestra una tendencia que permita establecer una CIVIV. La misma situación se presenta en el medio de menor concentración iónica que se muestra en la tabla 34 y la gráfica 8. En todos los medios antes descritos, el factor de similitud para las formulaciones A y B con respecto al producto de referencia, es mayor que 50 lo que sugiere que los perfiles son similares (tabla 44).

Los medios tamponados a pH 6,5 a los que se les adicionaron tensoactivos (LSS y Tween 20) se muestran en las tablas de la 35 a la 40 y en las gráficas de la 9 a la 14 y en éstas se observa una mayor disolución de candesartán cilexetilo que a los pHs anteriores. Esto sugiere que estos tensoactivos por efecto micelar aumentan la solubilidad y por tanto la disolución de este fármaco de baja solubilidad ⁽¹⁴⁷⁾ ⁽¹⁴⁸⁾. Este efecto micelar no se observa en los estudios de solubilidad en los medios FaSSGF y FaSSIF (tabla 15 y gráfica 3) pero los tensoactivos contenidos en estos medios (taurocolato sódico y lecitina) son de naturaleza química

distinta a los tensoactivos sintéticos. En investigaciones realizadas por Taupitz y Klein se señala que los medios en los que se emplean tensoactivos sintéticos como LSS y Tween 80 pueden resultar discriminatorios para evaluar diferencias en la disolución de fármacos poco solubles; los investigadores también señalan que la cantidad del surfactante es un parámetro crítico para obtener medios realmente predictivos, por lo que apoyan el empleo de tensoactivos sintéticos frente a otros medios biorrelevantes ⁽¹²⁴⁾.

Los perfiles en el medio pH 6,5 con LLS 0,1% (tabla 35, gráfica 9) presentan una disolución porcentual menor al 32% en general. La formulación B presenta una curva de disolución superior a la del producto de referencia y la formulación A y estas dos últimas presentan perfiles prácticamente superponibles; encontrándose que el factor de similitud para la formulación A es mayor que 50 y para la formulación B es inferior a 50, comportamiento que no se asemeja a lo encontrado *in vivo*.

Al aumentar la cantidad de LLS, de 0,1 a 1%, en el mismo tampón de pH 6,5, aumenta de forma significativa el porcentaje disuelto, alcanzando prácticamente el 85% de disolución, lo que era de esperar porque al aumentar la proporción de tensoactivo, aumenta la capacidad micelar y por tanto de solubilización del candesartán cilexetilo. El mecanismo por el cual la disolución aumenta en presencia de LLS fue explicado por Madelung y colaboradores, quienes observaron que al presentarse una alta concentración del tensoactivo en la interfaz sólido-líquido cuando el LLS se disuelve, aumenta la solubilidad de los fármacos poco solubles y por tanto mejoran su disolución ⁽¹⁴⁹⁾. Como se observa en la tabla 36 y gráfica 10, la formulación B presenta un perfil por encima del producto de referencia con un factor de similitud inferior que 50, mientras que la formulación A tiene un perfil por debajo del producto de referencia con un f_2 mayor que 50. Para la formulación A el comportamiento se asemeja a lo observado *in vivo*, pero no es el caso para la formulación B por lo que este medio no puede considerarse que prediga lo que ocurrirá *in vivo*.

Al tampón pH 6,5 se le agregaron cuatro concentraciones diferentes de Tween 20 (0,10; 1,15; 0,20 y 0,30%). En el perfil con la mayor cantidad de Tween 20 estudiada, 0,30% (tabla 37 y gráfica 11), se obtuvieron perfiles con porcentajes de disolución que en la asíntota superaron el 85% en todas las formulaciones, sin embargo, se sigue observando el patrón en el que la formulación B está por encima del producto de referencia y la formulación A está por debajo y al igual de lo observado en los medios con LSS, el factor de similitud entre referencia y formulación A es mayor que 50 y entre referencia y formulación B es menor que 50.

El mismo patrón descrito anteriormente se observa en los perfiles obtenidos en los medios pH 6,5 con Tween 20 0,20% (tabla 38 gráfica 12) y con Tween 20 0,15% (tabla 39, gráfica 13), sin embargo, en ambos casos el perfil de la formulación B con respecto al producto de referencia tiene un f_2 mayor que 50. Al estar la formulación B por encima del producto de referencia, los perfiles pierden su carácter predictivo de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de bioequivalencia.

En el medio pH 6,5 con Tween 20 0,10% (tabla 40, gráfica 14) el orden de los perfiles es similar al de los ensayos descritos anteriormente, en el que la formulación B está por encima del producto de referencia, sin embargo, en general el porcentaje de disolución de todas las formulaciones es menor que en los medios con mayor cantidad de Tween 20, situación que es de esperar porque en la medida en que aumenta la cantidad de tensoactivo, aumentará la solubilidad de un fármaco poco soluble como candesartán cilexetilo y por tanto aumentará también su disolución. El factor de similitud para ambas formulaciones con respecto al producto de referencia es superior a 50 por lo que las curvas se consideran similares.

En general, en estos perfiles se observa que la formulación A tiene una menor velocidad de disolución que el producto de referencia, que coincide con los datos obtenidos en el estudio en humanos, sin embargo, la formulación B, que igualmente es catalogada como como BE

bajo, muestra perfiles que están, en todos los casos, por encima del producto de referencia y por tanto, estos medios no resultan del todo predictivos.

El ensayo de velocidad de disolución realizado en el medio biopredictivo FaSSIF en el aparato II (tabla 41 y gráfica 15) muestra una disolución mayor a la de los medios tamponados descritos en la EP pero menor que la de los medios con tensoactivos. La formulación A presenta un perfil de disolución por debajo del producto de referencia (similar a lo que ocurre *in vivo*) y la formulación B por encima del mismo, que no corresponde a lo observado en humanos.

El uso de tensoactivos en los medios aumenta la disolución de candesartán cilexetilo. En el caso de los medios FaSSGF y FaSSIF la concentración de taurocolato es de 0,08 mM y 3 mM, respectivamente y estas concentraciones están por debajo de su concentración micelar crítica (10 mM). Situación contraria sucede con los medios con LSS y Tween 20 que en todos los medios superaron la concentración micelar crítica que es 0,24% para LSS y 0,004% para Tween 20. Esto explica el aumento significativo de la disolución de candesartán cilexetilo en los medios con estos tensoactivos sintéticos ⁽¹⁵⁰⁾.

En las tablas 44 se muestran los resultados del factor de similitud al comparar la cinética de disolución del producto de referencia con las formulaciones A y B de los ensayos realizados en el aparato II. En esta tabla se puede comprobar, tal como se describió con anterioridad, que el factor de similitud es inferior que 50 para la formulación B en los medios a pH 6,5 con LSS 0,1%; LSS 1% y Tween 20 0,30%. Sin embargo, la formulación A también debería mostrar factores de similitud por debajo de 50 ya que es la formulación con problema de bioequivalencia en el estudio en humanos.

Dado que los ensayos simples a pHs discretos realizados con el aparato II no resultaron representativos de lo que ocurre a nivel fisiológico se decidió probar con un sistema más complejo utilizando el aparato de disolución tipo IV. Con respecto a los perfiles de

disolución obtenidos en este aparato IV se puede observar que al emplear los medios tamponados pH 1,2, 4,5 y 6,8 con uso de Tween 20 al 0,20% la disolución es mayor que la de los medios biopredictivos FaSSGF y FaSSIF (tablas 42 y 43; gráficas 16 y 17, respectivamente). En los medios FaSSGF y FaSSIF usando el aparato IV los perfiles son prácticamente superponibles, no observándose diferencias importantes entre los perfiles de disolución de las formulaciones A, B y el producto de referencia. El cálculo de factor de similitud para estos perfiles (tabla 45) muestra que el resultado de f_2 para estos perfiles es mayor que 50, lo que indica que estos perfiles son similares en los medios y condiciones ensayadas.

En el ensayo realizado en el aparato IV con los medios pH 1,2; 4,5 y 6,8 con Tween 20 al 0,20% el factor de similitud es mayor que 50 para ambas formulaciones. Estos resultados apuntan a que tanto la formulación A como la B son similares al producto de referencia y por ello se pueden considerar formulaciones equivalentes, lo que concuerda con el resultado del ensayo de bioequivalencia en humanos. Estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio preliminar realizado con telmisartán, también fármaco clase II, en el que se estableció una CIVIV empleando el aparato IV y medios pH 1,2; 4,5 y 6,8 con 0,05% de Tween 80, demostrando que el uso de tensoactivos sintéticos puede resultar de utilidad para desarrollar sistemas biopredictivos ⁽¹⁵⁴⁾. Otro estudio realizado un fármaco clase II (metaxalona) estableció una CIVIV para formulaciones de liberación controlada empleando un medio a pH 4,5 con cloruro de sodio al 0,5% y LSS al 0,2% en el aparato II a 50 rpm ⁽¹⁵¹⁾.

Al comparar las condiciones del ensayo para candesartán con respecto a las del estudio donde se desarrolló una CIVIV para formulaciones de telmisartán, se emplea el mismo aparato a la misma velocidad pero los medios contienen tensoactivos diferentes y en concentraciones distintas. Con respecto al estudio realizado para metaxalona el único factor común es el uso de tensoactivo en el medio de disolución. Las investigaciones recientes apuntan al desarrollo de medios con el uso de tensoactivos sintéticos que permiten predecir el desempeño *in vivo* de formulaciones que contienen fármacos clase II.

Se seleccionó el ensayo de disolución realizado a las formulaciones de candesartán en el aparato IV con los medios pH 1,2; 4,5 y 6,8 con Tween 20 al 0,20 % a una velocidad de 8 mL/min, para profundizar en la CIVIV que se describe a continuación.

d) Correlación *in vivo-in vitro*

En la tabla 63 se muestran los datos de concentración plasmática de candesartán cilexetilo en función del tiempo del ensayo de bioequivalencia *in vivo* y la representación gráfica de dichos datos se puede observar en la gráfica 21; de acuerdo con los resultados del análisis de bioequivalencia *in vivo* de las formulaciones ensayadas, que se observa en la tabla 160, se concluye que todas las formulaciones son bioequivalentes, ya que los IC90% tanto de C_{max} como de AUC se encuentran dentro de los límites de 0,8-1,25. No obstante, se tratan de bioequivalentes bajos, ya que los intervalos no incluyen el 100%.

En la gráfica 22 se observa el perfil de fracciones absorbidas en función del tiempo calculadas con el modelo de Loo-Riegelman y en ella se puede observar que el perfil aumenta progresivamente hasta alcanzar una asíntota y por tanto se puede afirmar que el comportamiento de candesartán cilexetilo se ajusta al modelo bicompartimental. En la tabla 64 se muestran las fracciones absorbidas calculadas para cada tiempo con este método.

Con respecto a los perfiles de disolución, como se puede observar en la tabla 42, ninguna de las formulaciones llega al 100%, sin embargo, todas las formulaciones se hacen asintóticas en el tiempo por lo que se puede escalar la magnitud de % disuelto, considerando el porcentaje más alto como el 100% para con ello hacer las fracciones disueltas (f_{diss}) en función del tiempo y las fracciones absorbidas (f_a) en función del tiempo comparables y de este modo poder realizar la CIVIV. La tabla 65 y la gráfica 23 muestran los perfiles de disolución después de realizar el escalado antes señalado.

Para poder completar el perfil $f_{diss}-t$ y obtener los valores de f_{diss} a los tiempos a los que se disponía de valores de f_a se empleó el modelo de Weibull, para lo que se aplicaron las ecuaciones que se muestran en la tabla 66 para cada una de las formulaciones estudiadas. En las gráficas 24, 25 y 26 se observan el ajustado del perfil de disolución *in vitro* para el producto de referencia y las formulaciones A y B, respectivamente.

En la gráfica 27 se muestran los perfiles f_a-t y $f_{diss}-t$ y se puede apreciar que la disolución sucede más rápido que la absorción. Por esta razón se requiere un ajustado del tiempo que permita “estirar” el proceso de disolución. En la representación gráfica se limitó el perfil f_a-t a 10 h con la finalidad de observar con mayor claridad que los perfiles no son superponibles.

Al ajustar los valores de tiempo representados en la gráfica 28 a la ecuación de una recta se obtuvo la equivalencia de los tiempos *in vitro* con los caracterizados *in vivo*:

$$t_{vitro} = 0,161 + 0,383 \cdot t_{vivo}$$

Este escalado permitió la superposición de los perfiles f_a-t y $f_{diss}-t$, como puede observarse en la gráfica 29 y a su vez realizar la CIVIV representando las f_{diss} en función de las f_a (a los mismos tiempos), correspondiente a la gráfica 30. La relación entre ambas fracciones presenta un coeficiente de correlación, $r^2=0,968$, que es estadísticamente significativo.

$$f_a = 5,742 + 0,850 \cdot f_{diss}$$

A fin de evaluar la predictibilidad de la correlación se calcularon por reconvolución los datos de concentración plasmática para las tres formulaciones estudiadas, usando la ecuación anterior y los datos de f_{diss} . Los datos obtenidos por el procedimiento antes descrito se observan en la tabla 67. Se elaboraron gráficas de C_p en función del tiempo contrastando los datos predichos con los datos experimentales para cada formulación ensayada que se observan en las gráficas 31 (Referencia), 32 (formulación A) y 33 (formulación B). En dichas gráficas se puede apreciar visualmente que los datos predichos son muy similares a los

obtenidos experimentalmente y por tanto la curva de predicho se superpone sobre la curva experimental. En la tabla 68 se observan los resultados de la validación interna de la CIVIV. El %EP para cada parámetro y cada formulación están por debajo de 15% y el valor medio para cada parámetro es inferior al 10%, por lo que se considera válida la correlación.

En definitiva, el ensayo de disolución realizado en el aparato IV con los medios pH 1,2, 4,5 y 6,8 con Tween 20 al 0,20% a una velocidad de 8 mL/min es un método predictivo de lo que sucede en la realidad fisiológica para las formulaciones estudiadas de candesartán cilexetilo y por tanto, es un recurso que puede usarse para el desarrollo de nuevas formulaciones o para evaluar que los parámetros críticos de los procesos productivos se encuentran bajo control.

e) Ensayo de permeabilidad *in situ*

La constante de velocidad de absorción *in situ* en rata obtenida para candesartán cilexetilo en disolución (proporcional a su permeabilidad intrínseca) ha sido de $2,41 \text{ h}^{-1}$ (tabla 53). Este valor es mayor que $1,2 \text{ h}^{-1}$, que en el modelo animal utilizado corresponde con una fracción oral absorbida mayor que 85% lo que corrobora su clasificación como un fármaco de alta permeabilidad ⁽¹⁵³⁾ ⁽¹⁵⁴⁾.

Se estudió además en el modelo *in situ* el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de candesartán cilexetilo (tablas 46, 47 y 48) encontrándose que entre el producto de referencia y la formulación A no existen diferencias estadísticamente significativas para la constante de absorción. Entre la formulación B y el producto de referencia existen diferencias estadísticamente significativas resultando que la constante de absorción de la formulación B es más alta que la del producto de referencia (tablas 49 y 50; gráfica 18), lo que no concuerda con los datos obtenidos en los estudios en humanos.

Se empleó el mismo modelo para estudiar el efecto de algunos excipientes sobre la

permeabilidad de candesartán cilexetilo. En las tablas de la 53 a la 60 y en la gráfica 20 se muestran los resultados de los estudios del efecto de los excipientes estudiados sobre la permeabilidad de candesartán cilexetilo y se puede observar que para el fármaco se ve disminuida la constante de absorción en presencia de hidroxipropilcelulosa, almidón, estearato de magnesio y talco (tablas 61 y 62). La disminución de la constante de absorción podría deberse a un aumento de la viscosidad del medio por la presencia de los excipientes antes señalados que podría interferir con la difusión de las moléculas de fármaco hacia la membrana o a algún efecto directo de los excipientes sobre la bicapa lipídica, de mecanismo aun por dilucidar, que provoca un incremento en su resistencia a la difusión de solutos o disminución del coeficiente de reparto aparente del fármaco en la membrana. Para los otros excipientes ensayados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la constante de absorción.

4.2. Valsartán

a) Concentración de saturación

El estudio de solubilidad realizado para valsartán permitió obtener los resultados que están recogidos en la tabla 75. El perfil solubilidad-pH que se muestra en la gráfica 35 permite observar una curva propia de un ácido débil ionizable como valsartán y su pH de mayor solubilidad es el básico. En todos los pHs estudiados el número de dosis es mayor que la unidad y por tanto el presente estudio confirma que valsartán es un fármaco de baja solubilidad según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, lo que coincide con lo reportado en estudios previos ⁽¹⁵⁵⁾.

En la tabla 76 se muestra la concentración de saturación en los medios FaSSGF y FaSSIF. En estos medios se comprobó una solubilidad mayor que la encontrada en los medios tamponados descritos en la EP a pH 1,2; 4,5 y 6,8 aunque el número de dosis en estos medios es igualmente inferior a la unidad. Esta mayor solubilidad en los medios

biopredictivos puede atribuirse a solubilización micelar por la presencia de los tensoactivos propios de estos medios.

Con la finalidad de evaluar el efecto sobre la solubilidad del valsartán de algunos excipientes se realizó el ensayo de concentración de saturación en medio acuoso con y sin la adición de los excipientes. Los resultados obtenidos en este ensayo se pueden observar en la tabla 77 y gráfica 36. De acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Scheffe se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la solubilidad de valsartán y valsartán con los excipientes (tablas 78 y 79). Así, en presencia de los excipientes crospovidona, macrogol, talco, silicio y óxido de titanio valsartán presenta una menor solubilidad, que puede atribuirse a que tales excipientes evitan la solubilización de la molécula por disminuir el solvente disponible y por aportar hidrofobicidad a la superficie de las partículas de valsartán. Contrario a lo señalado para los excipientes antes mencionados, se encontró que estearato de magnesio, celulosa microcristalina e hidroximetilcelulosa aumentan la solubilidad de valsartán. Se requieren más estudios para establecer el mecanismo de estos excipientes para provocar tal aumento en la solubilidad de un principio activo poco soluble.

En la tabla 80 y gráfica 37 se pueden observar los resultados del estudio comparativo de la concentración de saturación del valsartán desde el producto de referencia y las formulaciones C y D. Se encontró que las formulaciones C y D presentan una mayor concentración de valsartán en el medio que el producto de referencia y dicha diferencia es estadísticamente significativa (tablas 81 y 82); esto se corresponde con lo encontrado en los estudios en humanos donde los productos C y D presentaban parámetros farmacocinéticos más elevados que el producto de referencia. La combinación de los excipientes con los que están formulados los productos C y D, puede estar provocando este incremento de la solubilidad del principio activo. Este aumento de la solubilidad puede llevar a un aumento de la disolución (ya que la relación entre la solubilidad y la disolución del fármaco es directa) y siendo valsartán un fármaco de clase II, la disolución es el parámetro que determina su biodisponibilidad ⁽¹⁵⁶⁾. Se ha documentado en varias

investigaciones que los excipientes pueden impactar sobre la biodisponibilidad de fármacos de diferente naturaleza y los resultados obtenidos en la presente investigación ponen en evidencia de nuevo tal efecto ⁽¹⁵⁷⁾.

b) Ensayo de disgregación

El ensayo de disgregación, aunque muestra que el producto de referencia es en promedio 0,2 minutos más lento en su capacidad de disgregarse (tabla 83) que las formulaciones C y D, no muestra diferencias tales que, pueda ser usado como ensayo preliminar de desempeño de las formulaciones de valsartán objeto de estudio en esta tesis.

c) Perfiles de disolución

Los perfiles obtenidos para el producto de referencia de valsartán y las formulaciones C y D en el aparato II, con los diferentes medios ensayados que se muestran en las tablas de 84 a 94 y se pueden observar en las gráficas de 38 a 48 presentan perfiles que se superponen y por tanto ninguna de estas condiciones de ensayo resultan útiles para predecir el comportamiento que se observó en el estudio en humanos. En la tabla 97 se pueden observar los resultados del factor de similitud para los diferentes medios ensayados en el aparato II, encontrándose que para la formulación D, cuando está permitido calcular f_2 , resulta mayor que 50, por lo que los perfiles se consideran similares, lo que no corresponde con lo observado en el estudio en humanos, en el que dicha formulación presenta una mayor biodisponibilidad que el producto de referencia. En el caso de la formulación C, que es BE con respecto al producto de referencia, presenta un f_2 por debajo de 50 en medio tamponado pH 6,5 con Tween 20 a 0,20%; esta diferencia no concuerda con el resultado en el estudio de bioequivalencia. En los demás medios, donde está permitido calcular el factor de similitud, los valores fueron mayores que 50, que era lo que se esperaba al comparar la formulación C con el producto de referencia.

En los perfiles obtenidos con el aparato IV (tablas 95 y 96; gráficas 49 y 50) puede observarse que las curvas se cruzan. En ciertos intervalos de tiempo y especialmente el perfil mostrado en la gráfica 49 que corresponde a los medios tamponados a pH 1,2; 4,5 y 6,8 a los que se les adicionó Tween 20 al 0,20% existen importantes diferencias en determinados intervalos de tiempo. Sin embargo, a pesar de estas diferencias, tal como se puede observar en la tabla 98, los factores de similitud globales entre el producto de referencia y las formulaciones C y D en estas condiciones de ensayo son superiores a 50 por lo que los perfiles se consideran estadísticamente similares.

Por lo anteriormente expuesto se puede afirmar que con las condiciones ensayadas (aparatos II y IV) y empleando los medios estudiados no es posible predecir el comportamiento observado *in vivo* para las formulaciones de valsartán objeto del presente estudio ya que la formulación D tiene una velocidad y cantidad de fármaco absorbido mayor que el producto de referencia, aspecto que no es capaz de reproducir ninguno de los medios de disolución y condiciones ensayadas. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que se podría llegar a encontrar un modelo predictivo *in vitro*, para lo que se requiere realizar nuevos estudios en otras condiciones y con otros medios diferentes a los presentados en esta investigación.

Un estudio reciente realizado usando el aparato II para evaluar el efecto de los parámetros fisiológicos de los fluidos gastrointestinales sobre la disolución de valsartán concluye que la disolución de este fármaco depende del pH y de la capacidad amortiguadora del sistema tampón, mientras que la disolución es independiente de la fuerza iónica ⁽¹⁵⁸⁾. Las conclusiones de Hamed permiten orientar los medios que deben probarse a fin de encontrar condiciones *in vitro* que se correlacionen con los datos *in vivo*.

d) Ensayo de permeabilidad *in situ*

Al igual que para candesartán cilexetilo, el parámetro evaluado como representativo del

proceso de absorción fue la constante aparente de velocidad de absorción. Se estudió con el modelo descrito por Doluisio el efecto de las formulaciones y de los excipientes sobre la permeabilidad de valsartán. La constante de velocidad de absorción, obtenida en el modelo antes señalado, para valsartán en disolución fue de $0,55 \text{ h}^{-1}$ (tabla 104) y ese valor es menor que $1,2 \text{ h}^{-1}$, que en el modelo animal utilizado corresponde con una fracción oral absorbida mayor que 85%, por lo que, los resultados obtenidos en la presente investigación, no coincide con lo encontrado en la bibliografía donde se clasifica a valsartán como un fármaco clase II en el marco del SCB ⁽¹⁵³⁾ ⁽¹⁵⁹⁾.

Los resultados del estudio en este modelo para evaluar el efecto de la formulación se muestran en las tablas 99 a 101 y en la gráfica 51, encontrándose que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las constantes de absorción del producto de referencia y las formulaciones C y D (tabla 102), por lo que se puede concluir que las formulaciones no tienen efecto sobre la permeabilidad de valsartán. La gráfica 52 ratifica la afirmación anterior, ya que la constante de absorción del fármaco no muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a la constante de absorción obtenida a partir de las formulaciones de Referencia de valsartán, C y D (tabla 103).

El estudio del efecto de algunos excipientes sobre la constante aparente de velocidad de absorción de valsartán se puede observar en las tablas de la 104 a la 112 y se resume en la gráfica 53, encontrándose, como se puede observar en la tabla 113, que no existen diferencias estadísticamente significativas entre valsartán y el mismo principio activo con los excipientes estudiados (crospovidona, estearato de magnesio, celulosa microcristalina, macrogol, hidroximetilcelulosa, talco, dióxido de titanio y silicio). De acuerdo a lo encontrado en investigaciones previas, los excipientes pueden afectar el proceso de absorción de fármacos por diversos mecanismos pero esto no se evidencia en la investigación realizada para valsartán ⁽⁷⁴⁾ ⁽⁷³⁾.

4.3. Clonazepam

a) Concentración de saturación

El perfil de solubilidad-pH que se muestra en la gráfica 55 presenta una solubilidad para clonazepam prácticamente constante a lo largo de los pHs estudiados. La baja solubilidad de este principio activo (tabla 120) en las condiciones del tracto gastrointestinal hace que el número de dosis a pH 1,2; 4,5 y 6,8 sea superior a la unidad, lo que confirma que clonazepam es un fármaco de baja solubilidad según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico. Estos resultados coinciden con los reportados en la bibliografía ⁽¹⁶⁰⁾.

Las concentraciones de saturación de clonazepam en los medios biopredictivos FaSSGF y FaSSIF que se pueden observar en la tabla 121, son más altas que las observadas en los medios tamponados descritos en la EP, lo que indica que la presencia de tensoactivos en el medio aumenta la solubilidad del principio activo por lo que las micelas favorecen su solubilización. Éste es un fármaco de alta lipofilia y en la presente investigación se demuestra que los tensoactivos incrementan su solubilización de forma muy importante ⁽¹⁶¹⁾.

En los ensayos para evaluar el efecto de los excipientes sobre la solubilización de clonazepam (tabla 122 y gráfica 56) se encontró que la concentración de saturación de este principio activo disminuye en presencia de almidón y celulosa microcristalina mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a la concentración de saturación de clonazepam, como se puede observar en las tablas 123 y 124. El almidón es un excipiente de gran uso en la fabricación de comprimidos y se emplea como diluyente y disgregante. La celulosa microcristalina también es un excipiente que se usa como diluyente y disgregante usado en la confección de comprimidos. Es usado además como antiadherente y aglutinante ⁽¹⁶²⁾. Estos excipientes son inque y podrían al formar dispersiones disminuir la disponibilidad de solvente para la solubilización de clonazepam.

En el estudio comparativo de la concentración de saturación de clonazepam desde las formulaciones estudiadas que se puede observar en la tabla 125 y gráfica 57 se encontró que la formulación F presenta una concentración mayor que el producto de referencia, existiendo diferencias estadísticamente significativas (tablas 126 y 127), lo que se correlaciona con los datos encontrados en los estudios en humanos, ya que la concentración plasmática máxima de la formulación F está por encima de la del producto de referencia. Estos resultados sugieren que la composición en cuanto a excipientes de la formulación F incrementa la solubilidad de clonazepam y esto podría ser la razón para que los parámetros farmacocinéticos de esta formulación sean mayores que los del producto de referencia, poniendo de manifiesto que los excipientes pueden afectar la biodisponibilidad de los fármacos por aumentar la solubilidad de los mismos ⁽¹⁶³⁾.

b) Ensayo de disgregación

Los resultados del ensayo de disgregación para las diferentes formulaciones objeto de estudio de clonazepam se muestran en la tabla 128, encontrándose que los tiempos de disgregación promedio de las formulaciones de referencia y E son similares y para la formulación F es solo 0,2 minutos más bajo que para el producto de referencia; por lo que este ensayo no permite predecir el desempeño *in vivo* de las formulaciones estudiadas de clonazepam.

c) Perfiles de disolución

En las formulaciones de clonazepam estudiadas, los perfiles de disolución correspondientes a los medios tamponados a pH 1,2; 4,5 y 6,8 recomendados en las guías de bioexenciones de la EMA realizados en el aparato II (tablas 129 a 131 y gráficas 58 a 60, respectivamente),

así como en el medio pH 6,8 con menor concentración iónica (10 mM) correspondiente a la gráfica 61 y tabla 132, mostraron porcentajes disueltos en función del tiempo muy similares para todas las formulaciones estudiadas, aunque la formulación F presenta un porcentaje disuelto ligeramente superior al producto de referencia y a la formulación E. Los otros ensayos realizados en el aparato II, que corresponden a los medios a pH 6,5 con adición de los tensoactivos LSS y Tween 20, así como el medio biopredictivo FaSSIF, muestran porcentajes disueltos análogos para las tres formulaciones estudiadas (tablas 133 a 139 y gráficas 62 a 68). Los resultados del cálculo de f_2 que se muestra en la tabla 142, permite establecer similitud en las curvas de los perfiles realizados en todos los medios estudiados en el aparato II y por tanto estos ensayos no resultan discriminativos y no pueden considerarse como predictivos de lo que sucede en humanos.

En los estudios de disolución realizados con el aparato IV se muestra una tendencia de mayor disolución para la formulación F, lo que se corresponde con lo obtenido en el estudio en humanos. Para los medios FaSSGF y FaSSIF (tabla 141 y gráfica 70) aunque la formulación F presenta un mayor porcentaje disuelto, el cálculo del factor de similitud entre dicha formulación y el producto de referencia es mayor que 50 por lo que se considera que los perfiles son similares (tabla 143). En la tabla 140 y gráfica 69 se muestran los perfiles de disolución en los medios pH 1,2; 4,5 y 6,8 con Tween 20 al 0,20% y en dicha gráfica se observa claramente que la formulación F tiene una velocidad de disolución superior que el producto de referencia lo que se correlaciona con los datos obtenidos en el estudio de bioequivalencia. Se requieren estudios adicionales a fin de establecer el modelo matemático que permite correlacionar los datos *in vitro* con los obtenidos *in vivo*. Esto pone de manifiesto además la utilidad del uso de tensoactivos sintéticos en el diseño de medios de disolución que resultan predictivos y son más estables y económicos que los medios FaSSGF y FaSSIF ⁽¹²³⁾ ⁽¹⁵¹⁾.

d) Ensayo de permeabilidad *in situ*

En el estudio del proceso de absorción del clonazepam, que fue realizado en el modelo *in situ*, la constante de absorción del fármaco fue el parámetro representativo de dicho proceso. La constante de velocidad de absorción *in situ* en rata que se obtuvo para clonazepam en disolución, que es proporcional a su permeabilidad intrínseca, fue de 1,61 h⁻¹ (tabla 144); siendo este valor mayor que 1,2 h⁻¹, que en el modelo animal utilizado corresponde con una fracción oral absorbida mayor que 85%, permite corroborar su clasificación como un fármaco de alta permeabilidad ⁽¹⁵³⁾ ⁽¹⁶⁴⁾.

En las tablas de la 144 a la 146 se muestran los resultados del estudio en el modelo *in situ* para evaluar las diferencias en las constantes de absorción de clonazepam desde las tres formulaciones estudiadas y la comparación entre los valores de constantes obtenidas se puede observar en la gráfica 71, encontrándose que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el producto de referencia y las formulaciones E y F (tabla 137) por lo que se puede afirmar que la permeabilidad de clonazepam no se ve influenciada por efecto de las formulaciones estudiadas. Al comparar la constante de absorción de clonazepam desde una solución preparada con el principio activo (tabla 149) y las constantes de absorción obtenidas desde las formulaciones de referencia, E y F (gráfica 72) se encuentra que el fármaco no muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a las formulaciones estudiadas, lo que sugiere al igual que en la comparación anterior, que la composición de las formulaciones no afecta la absorción de clonazepam.

En los ensayos para evaluar el efecto de algunos excipientes sobre la permeabilidad de clonazepam realizados en el modelo *in situ* (tablas de 149 a 156 y gráfica 73) se encontró que lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, povidona, celulosa microcristalina no muestran efecto sobre la constante de absorción de clonazepam (tabla 157). Al poseer este fármaco una alta lipofilia se espera que el mismo pase a través de la membrana intestinal y en estas circunstancias los excipientes no tienen un efecto importante sobre la permeabilidad de este fármaco.

CONCLUSIONES

1. Los estudios experimentales de solubilidad y permeabilidad realizados para candesartán cilexetilo y clonazepam permiten confirmar su clasificación como fármacos clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico. Los resultados de solubilidad y permeabilidad obtenidos en la presente investigación para valsartán lo clasifican como un fármaco clase IV.
2. La formulación B de candesartán cilexetilo muestra una mayor permeabilidad que el producto de Referencia que no concuerda con lo observado *in vivo*. Las formulaciones de

valsartán y clonazepam no muestran diferencias en la permeabilidad con respecto al producto de Referencia.

3. La permeabilidad de candesartán cilexetil se ve disminuida frente a los excipientes hidroxipropilcelulosa, almidón, estearato de magnesio y talco. El mecanismo de este efecto no se ha elucidado, puede deberse al aumento en la viscosidad del medio que enlentece la difusión, o a un efecto directo de los excipientes sobre la bicapa lipídica que incrementa su resistencia, o una disminución del coeficiente de reparto aparente del fármaco en la membrana. Valsartán y clonazepam no muestran cambios en la permeabilidad frente a los excipientes estudiados.

4. Los ensayos de disolución empleados en bioequivalencias (Aparato USP II a 50 rpm con medios pH 1,2; 4,5 y 6,8) no han reflejado los resultados de los estudios de bioequivalencia *in vivo* para ninguno de los principios activos estudiados, lo que confirma la necesidad de desarrollar medios biopredictivos para los principios activos clase II a fin de predecir el desempeño *in vivo*.

5. El almidón provoca una disminución de la solubilidad de candesartán cilexetil y clonazepam. Candesartán cilexetil y valsartán muestran menos solubilidad en presencia de talco y macrogol. Para candesartán cilexetil la solubilidad se ve disminuida además por lactosa, hidroximetilcelulosa y estearato de magnesio. Valsartán presenta una mayor solubilidad cuando están presentes los excipientes estearato de magnesio, celulosa microcristalina e hidroximetilcelulosa y una menor solubilidad frente a crospovidona, óxido de titanio y silicio. Clonazepam disminuye su solubilidad cuando está presente la celulosa microcristalina.

6. El ensayo de disolución realizado en el aparato IV con los medios pH 1,2, 4,5 y 6,8 con Tween 20 al 0,20% a una velocidad de 8 mL/min es un método predictivo de lo que sucede en la realidad fisiológica para las formulaciones estudiadas de candesartán cilexetil y por tanto, es un recurso que puede usarse para el desarrollo de nuevas formulaciones o para evaluar que los parámetros críticos de los procesos productivos se encuentran bajo control. El mismo ensayo resulta predictivo para las formulaciones estudiadas de clonazepam. No ha sido posible el desarrollo de ningún método biopredictivo para valsartán.

7. Se ha desarrollado una correlación tipo A para candesartán cilexetilo de tipo lineal con un $r^2 > 0,9$ y con errores de predicción de 4,71 % para Cmax y 3,86 % para AUC lo que valida el método de disolución realizado en aparato IV con medios pH 1,2; 4,5 y 6,8 con 0,20% de Tween 20 como útil para sustituir ensayos de bioequivalencia *in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ley 29/2009 de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Boletín Oficial del Estado Nº 178 (27/06/2016).
2. World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Geneva: WHO; 1992. 32th Report, Series 823.
3. World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Geneva: WHO; 2010. 43th Report, Series 957.
4. Polli J. *In vitro* studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic *in vivo* studies in assessing bioequivalence of immediate-release

- solid oral dosage forms. AAPS J. 2008; 10 (2): 289-299.
5. Food and Drug Administration. Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products - general considerations. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Rockville, USA: FDA; 2003. Series 21 CFR 320.
 6. World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Geneva: WHO; 2006. 36th Report, Series 902.
 7. Food and Drug Administration. Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products - general considerations. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Rockville, USA: FDA; 2003. Series 21 CFR 320.
 8. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency (EMA). Guideline on the Investigation of Bioequivalence, London, 20-1-2010.
 9. G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, and J.R. Crison. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical research*. 12:413-420 (1995).
 10. R. Lobenberg and G.L. Amidon. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 50:3-12 (2000).
 11. G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, and J.R. Crison. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical research*. 12:413-420 (1995).
 12. R. Lobenberg and G.L. Amidon. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to

- international regulatory standards. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 50:3-12 (2000).
13. Y. Tsume, D.M. Mudie, P. Langguth, G.E. Amidon, and G.L. Amidon. The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. *European journal of pharmaceutical sciences* : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences (2014).
 14. K.S. Amidon, P. Langguth, H. Lennernas, L. Yu, and G.L. Amidon. Bioequivalence of oral products and the biopharmaceutics classification system: science, regulation, and public policy. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 90:467-470 (2011).
 15. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency (EMA). Guideline on the Investigation of Bioequivalence, London, 20-1-2010.
 16. A. Glomme, J. Marz, and J.B. Dressman. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *Journal of pharmaceutical sciences*. 94:1-16 (2005).
 17. T.-N. Krisztina. Solubility-pH profile of drugs. Experiences and surprises in logS measurements, *PhysChem FORUM 9*, Barcelona, 2010.
 18. A.T. Serajuddin. Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliv Rev*. 59:603-616 (2007).
 19. M. Veiga O, M. Gil A, and J. Torrado D. Preformulación. In J. Vila Jato (ed.), *Tecnología Farmacéutica, Vol. I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*, Síntesis, 1997.
 20. Higuchi T, Connors K. Phase-solubility techniques. *Adv Anal Chem Instrum*. 1965;7:117-212.
 21. Baka E, Comer J, Takács-Novák K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. *J Pharmaceut Biomed Anal*. 2008; 46 (2): 335-341.

22. A. Glomme, J. Marz, and J.B. Dressman. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *Journal of pharmaceutical sciences*. 94:1-16 (2005).
23. A. Glomme, J. Marz, and J.B. Dressman. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *Journal of pharmaceutical sciences*. 94:1-16 (2005).
24. Cabrera-Pérez, Miguel Ángel y Pham The Hai. Sección solubilidad: Métodos in silico para la predicción de la solubilidad de fármacos. Aproximaciones al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico. En: González Álvarez, Isabel, Cabrera Pérez Miguel Ángel y Bermejo Sanz Marival. *Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos*. Universidad Miguel Hernández de Elche, 2015.
25. A. Glomme, J. Marz, and J.B. Dressman. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *Journal of pharmaceutical sciences*. 94:1-16 (2005).
26. Cabrera-Pérez, Miguel Ángel y Pham The Hai. Sección solubilidad: Métodos in silico para la predicción de la solubilidad de fármacos. Aproximaciones al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico. En: González Álvarez, Isabel, Cabrera Pérez Miguel Ángel y Bermejo Sanz Marival. *Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos*. Universidad Miguel Hernández de Elche, 2015.
27. R. Panakanti and A. Narang. Impact of excipient interactions on drug bioavailability from solid dosage forms. *Pharmaceutical research*. 29:2639-2659 (2012).
28. Potthast H, Dressman JB, Junginger HE, Midha KK, Oeser H, Shah VP, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ibuprofen. *J Pharm Sci*. 2005;94(10):2121–31.
29. Badawy SI, Hussain MA. Microenvironmental pH modulation in solid dosage forms. *J Pharm Sci*. 2007;96(5):948–59.
30. Popielec A, Loftsson T. Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs. *Int J Pharm*. 2017; 531(2): 532-542.

31. Vijaya Kumar SG, Mishra DN. Preparation, characterization and *in vitro* dissolution studies of solid dispersion of meloxicam with PEG 6000. *Yakugaku Zasshi*. 2006;126(8):657–64.
32. Al-Hamidi H, Edwards AA, Mohammad MA, Nokhodchi A. To enhance dissolution rate of poorly water-soluble drugs: glucosamine hydrochloride as a potential carrier in solid dispersion formulations. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;76(1):170–8.
33. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). MD 2015. Waiver of *In Vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.
34. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. London, 2015. Guidelines on the investigation of bioequivalence.
35. World Health Organization. Switzerland, 2014. Multisource (Generic) Pharmaceutical Products: Guidelines on Registration Requirements to establish interchangeability.
36. T. Incecayir, Y. Tsume, and G.L. Amidon. Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and Caco-2 cells: use as a reference standard for BCS classification. *Molecular pharmaceutics*. 10:958-966 (2013).
37. H.P. Gschwind, U. Glaenzel, F. Waldmeier, B. Wirz, H.D. Sabia, F. Picard, H.M. Weiss, L. Choi, P.J. Swart, A. Vasudevan, and M. Azria. Metabolism and disposition of the oral absorption enhancer ¹⁴C-radiolabeled 8-(N-2-hydroxy-5-chlorobenzoyl)-amino-caprylic acid (5-CNAC) in healthy postmenopausal women and supplementary investigations *in vitro*. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 47:44-55 (2012).
38. S. Winiwarter, N.M. Bonham, F. Ax, A. Hallberg, H. Lennernas, and A. Karlen. Correlation of human jejunal permeability (*in vivo*) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach.

- Journal of medicinal chemistry. 41:4939-4949 (1998).
39. H. Lennernas, L. Knutson, T. Knutson, A. Hussain, L. Lesko, T. Salmonson, and G.L. Amidon. The effect of amiloride on the *in vivo* effective permeability of amoxicillin in human jejunum: experience from a regional perfusion technique. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. 15:271-277 (2002).
 40. D. Fleisher. Peptide-based drug design. Gastrointestinal transport of peptides, A.C.S. books, American Chemical Society, Washington D.C., 1995, pp. 500-523.
 41. J.T. Doluisio, N.F. Billups, L.W. Dittert, E.T. Sugita, and J.V. Swintosky. Drug absorption. I. An *in situ* rat gut technique yielding realistic absorption rates. Journal of pharmaceutical sciences. 58:1196-1200 (1969).
 42. L.S. Schanker, D.J. Tocco, B.B. Brodie, and C.A. Hogben. Absorption of drugs from the rat small intestine. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 123:81-88 (1958).
 43. S. Ganta, P. Sharma, and S. Garg. Permeability Assessment. In S. Cox Gad (ed.), Preclinical Development Handbook, John Wiley & Sons, Inc, United States of America, 2008.
 44. K. Sugano, Y. Nabuchi, M. Machida, and Y. Aso. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. International journal of pharmaceutics. 257:245-251 (2003).
 45. M. Bermejo, A. Avdeef, A. Ruiz, R. Nalda, J.A. Ruell, O. Tsinman, I. Gonzalez, C. Fernandez, G. Sanchez, T.M. Garrigues, and V. Merino. PAMPA--a drug absorption *in vitro* model 7. Comparing rat *in situ*, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. 21:429-441 (2004).
 46. F. Delie and W. Rubas. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems. 14:221-286 (1997).

47. M. Rousset. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*. 68:1035-1040 (1986).
48. A. Zweibaum, M. Laburthe and Louvard D. Use of culture cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. *Handbook of physiology The gastrointestinal system*, American Physiology Society, Bethesda, MD, 1991, pp. 223-255.
49. T. Prueksaritanont, L.M. Gorham, J.H. Hochman, L.O. Tran, and K.P. Vyas. Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 24:634-642 (1996).
50. M. Mehran, E. Levy, M. Bendayan, and E. Seidman. Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 33:118-128 (1997).
51. P. Artursson, K. Palm, and K. Luthman. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*. 46:27-43 (2001).
52. P. Artursson and J. Karlsson. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 175:880-885 (1991).
53. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). MD 2015. Waiver of *In Vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.
54. S. Ganta, P. Sharma, and S. Garg. Permeability Assessment. In S. Cox Gad (ed.), *Preclinical Development Handbook*, John Wiley & Sons, Inc, United States of America, 2008.
55. B.H. Stewart, O.H. Chan, R.H. Lu, E.L. Reyner, H.L. Schmid, H.W. Hamilton, B.A. Steinbaugh, and M.D. Taylor. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple *in vitro* and *in situ* models: relationship to absorption in humans.

- Pharmaceutical research. 12:693-699 (1995).
56. A. Pagliara, M. Reist, S. Geinoz, P.A. Carrupt, and B. Testa. Evaluation and prediction of drug permeation. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 51:1339-1357 (1999).
57. A. Diez-Sampedro, M. Perez, M.T. Cobo, J.A. Martinez, and A. Barber. Effect of different beta-adrenergic agonists on the intestinal absorption of galactose and phenylalanine. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 50:907-911 (1998).
58. B.H. Stewart, G.L. Amidon, and R.K. Brabec. Uptake of prodrugs by rat intestinal mucosal cells: mechanism and pharmaceutical implications. *Journal of pharmaceutical sciences*. 75:940-945 (1986).
59. Camenisch G, Folkers G, Van de Waterbeemd H. 1998. Shapes of membrane permeability-lipophilicity curves: Extension of theoretical models with an aqueous pore pathway. *Eur J Pharm Sci* 6:325–333.
60. Cabrera-Pérez, Miguel Ángel y Pham The Hai. Sección permeabilidad: Métodos in silico para la predicción de la permeabilidad de fármacos. Aproximaciones al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico. En: González Álvarez, Isabel, Cabrera Pérez Miguel Ángel y Bermejo Sanz Marival. *Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos*. Universidad Miguel Hernández de Elche, 2015.
61. K. Kelly, B. O'Mahony, B. Lindsay, T. Jones, T.J. Grattan, A. Rostami-Hodjegan, H.N. Stevens, and C.G. Wilson. Comparison of the rates of disintegration, gastric emptying, and drug absorption following administration of a new and a conventional paracetamol formulation, using gamma scintigraphy. *Pharmaceutical research*. 20:1668-1673 (2003).
62. R. Kato, A. Takanaka, K. Onoda, and Y. Omori. Effect of syrup on the absorption of drugs from gastrointestinal tract. *Japanese journal of pharmacology*. 19:331-342 (1969).
63. S. Pestel, H.J. Martin, G.M. Maier, and B. Guth. Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal, and liver function in rats. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 54:200-214 (2006).

64. D.A. Adkin, S.S. Davis, R.A. Sparrow, P.D. Huckle, A.J. Phillips, and I.R. Wilding. The effects of pharmaceutical excipients on small intestinal transit. *British journal of clinical pharmacology*. 39:381-387 (1995).
65. D.A. Adkin, S.S. Davis, R.A. Sparrow, P.D. Huckle, A.J. Phillips, and I.R. Wilding. The effect of different concentrations of mannitol in solution on small intestinal transit: implications for drug absorption. *Pharmaceutical research*. 12:393-396 (1995).
66. A.W. Basit, J.M. Newton, M.D. Short, W.A. Waddington, P.J. Ell, and L.F. Lacey. The effect of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit: implications for the formulation of poorly-water soluble drugs. *Pharmaceutical research*. 18:1146-1150 (2001).
67. J. Goole, D.J. Lindley, W. Roth, S.M. Carl, K. Amighi, J.M. Kauffmann, and G.T. Knipp. The effects of excipients on transporter mediated absorption. *International journal of pharmaceutics*. 393:17-31 (2010).
68. G. Martin, C. Marriott, and I. Kellaway. Direct effect of bile salts and phospholipids on the physical properties of mucus. *Gut*. 19:103-107 (1978).
69. M. Tomita, M. Hayashi, T. Horie, T. Ishizawa, and S. Awazu. Enhancement of colonic drug absorption by the transcellular permeation route. *Pharmaceutical research*. 5:786-789 (1988).
70. B.D. Rege, L.X. Yu, A.S. Hussain, and J.E. Polli. Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs. *Journal of pharmaceutical sciences*. 90:1776-1786 (2001).
71. N.A. Peppas and N.J. Kavimandan. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 29:183-197 (2006).
72. G. Larocque, A.A. Arnold, E. Chartrand, Y. Mouget, and I. Marcotte. Effect of sodium bicarbonate as a pharmaceutical formulation excipient on the interaction of fluvastatin with membrane phospholipids. *European biophysics journal : EBJ*.

- 39:1637-1647 (2010).
73. Y. Takizawa, H. Kishimoto, M. Nakagawa, N. Sakamoto, Y. Tobe, T. Furuya, M. Tomita, and M. Hayashi. Effects of pharmaceutical excipients on membrane permeability in rat small intestine. *International journal of pharmaceutics*. 453:363-370 (2013).
74. Goole J, Lindley DJ, Roth W et al. The effects of excipients on transporter mediated absorption. *Int. J. Pharm.* 393(1–2), 17–31 (2010).
75. J. Ferte. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *European journal of biochemistry / FEBS*. 267:277-294 (2000).
76. L. Bromberg and V. Alakhov. Effects of polyether-modified poly(acrylic acid) microgels on doxorubicin transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 88:11-22 (2003).
77. Merino Sanjuán Virginia, Catalán Latorre Ana, Casabó Alós Vicente Germán, Merino Sanjuán Matilde. Absorción gastrointestinal de fármacos. En: González Álvarez, Isabel, Cabrera Pérez Miguel Ángel y Bermejo Sanz Marival. *Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos*. Universidad Miguel Hernández de Elche, 2015.
78. Regev R, Katzir H, Yeheskely-Hayon D, Eytan GD. Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by acceleration of passive drug permeation across the plasma membrane. *FEBS J.* 274(23), 6204–6214 (2007).
79. Hanke U, May K, Rozehnal V, Nagel S, Siegmund W, Weitschies W. Commonly used nonionic surfactants interact differently with the human efflux transporters ABCB1 (p-glycoprotein) and ABCC2 (MRP2). (*Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76(2), 260–268 (2010).
80. Rege BD, Kao JP, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Sci.* 16(4–5), 237–246 (2002).

81. Ashiru-Oredope DA, Patel N, Forbes B, Patel R, Basit AW. The effect of polyoxyethylene polymers on the transport of ranitidine in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 409(1–2), 164–168 (2011).
82. Weinheimer M, Fricker G, Burhenne J, Mylius P, Schubert R. The application of P-gp inhibiting phospholipids as novel oral bioavailability enhancers – an *in vitro* and *in vivo* comparison. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2016).
83. Li L, Yi T, Lam CW. Inhibition of human efflux transporter ABCC2 (MRP2) by self-emulsifying drug delivery system: influences of concentration and combination of excipients. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 17(4), 447–460 (2014).
84. Legen I, Kracun M, Salobir M, Kerc J. The evaluation of some pharmaceutically acceptable excipients as permeation enhancers for amoxicillin. *Int. J. Pharm.* 308(1–2), 84–89 (2006).
85. Yamagata T, Kusuhara H, Morishita M, Takayama K, Benameur H, Sugiyama Y. Effect of excipients on breast cancer resistance protein substrate uptake activity. *J. Control Rel.* 124(1–2), 1–5 (2007).
86. Engel A, Oswald S, Siegmund W, Keiser M. Pharmaceutical excipients influence the function of human uptake transporting proteins. *Mol. Pharm.* 9(9), 2577–2581 (2012).
87. Ren X, Mao X, Si L et al. Pharmaceutical excipients inhibit cytochrome P450 activity in cell free systems and after systemic administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70(1), 279–288 (2008).
88. Bravo González RC, Huwyler J, Boess F, Walter I, Bittner B. *In vitro* investigation on the impact of the surface-active excipients Cremophor EL, Tween 80 and Solutol HS 15 on the metabolism of midazolam. *Biopharm. Drug Dispos.* 25(1), 37–49 (2004).
89. Johnson BM, Charman WN, Porter CJ. An *in vitro* examination of the impact of polyethylene glycol 400, Pluronic P85, and vitamin E d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate on P-glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine. *AAPS PharmSci.* 4(4), E40 (2002).

90. Christiansen A, Backensfeld T, Denner K, Weitschies W. Effects of non-ionic surfactants on cytochrome P450-mediated metabolism *in vitro*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 78(1), 166–172 (2011).
91. Ishikawa M, Yoshii H, Furuta T. Interaction of modified cyclodextrins with cytochrome P-450. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69(1), 246–248 (2005).
92. Vasconcelos T, Marques S, Sarmiento B. The biopharmaceutical classification system of excipients. Ther Deliv. 2017 Feb;8(2):65-78.
93. A. Dokoumetzidis and P. Macheras. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. International journal of pharmaceutics. 321:1-11 (2006).
94. Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 38 NF 33, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD (2015).
95. Bou-Chacra N, Melo KJC, Morales IAC, Stippler ES, Kesisoglou F, Yazdanian M, Löbenberg R. Evolution of Choice of Solubility and Dissolution Media After Two Decades of Biopharmaceutical Classification System. AAPS J. 2017 Jul;19(4):989-1001. 2017).
96. C. Tong, S.S. D'Souza, J.E. Parker, and T. Mirza. Commentary on AAPS Workshop: dissolution testing for the twenty-first century: linking critical quality attributes and critical process parameters to clinically relevant dissolution. Pharmaceutical research. 24:1603-1607 (2007).
97. V. Gray, G. Kelly, M. Xia, C. Butler, S. Thomas, and S. Mayock. The science of USP 1 and 2 dissolution: present challenges and future relevance. Pharmaceutical research. 26:1289-1302 (2009).
98. S. Klein. The use of biorelevant dissolution media to forecast the *in vivo* performance of a drug. The AAPS journal. 12:397-406 (2010).
99. *Adaptado de D.M. Mudie, G.L. Amidon, and G.E. Amidon. Physiological parameters for oral delivery and in vitro testing. Molecular pharmaceutics. 7:1388-1405 (2010).*
100. Z.M. Gao, T. and Domb, W. Vibration Effects on Dissolution Tests with USP

- Apparatuses 1 and 2. Journal of Pharmaceutical Sciences. 97:3335-3343 (2008).
101. C.K. Brown, L. Buhse, H.D. Friedel, S. Keitel, J. Kraemer, J.M. Morris, M. Stickelmeyer, C. Yomota, and V.P. Shah. FIP position paper on qualification of paddle and basket dissolution apparatus. AAPS PharmSciTech. 10:924-927 (2009).
102. E.S. Kostewicz, B. Abrahamsson, M. Brewster, J. Brouwers, J. Butler, S. Carlert, P.A. Dickinson, J. Dressman, R. Holm, S. Klein, J. Mann, M. McAllister, M. Minekus, U. Muenster, A. Mullertz, M. Verwei, M. Vertzoni, W. Weitschies, and P. Augustijns. *In vitro* models for the prediction of *in vivo* performance of oral dosage forms. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences (2013).
103. L.G. McCarthy, G. Bradley, J.C. Sexton, O.I. Corrigan, and A.M. Healy. Computational fluid dynamics modeling of the paddle dissolution apparatus: agitation rate, mixing patterns, and fluid velocities. AAPS PharmSciTech. 5:e31 (2004).
104. S.A. Qureshi and J. Shabnam. Cause of high variability in drug dissolution testing and its impact on setting tolerances. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. 12:271-276 (2001).
105. C. Collins and R. Nair. Comparative evaluation of mixing dynamics in USP Apparatus 2 using standard USP vessels and PEAK vessels. Dissolution Technol. 5: (1998).
106. T.J. Mirza, Y.; Liu, Q. and Vivilecchia, R. Evaluation of dissolution hydrodynamics in the USP, Peak and flat-bottom vessels using different solubility drugs. Dissolution Technol. 12:11-16 (2005).
107. Z.M. Gao, T.; Smith, A.; Doub, W. and Westenberger, B. Studies of Variability in Dissolution Testing with USP Apparatus 2. Journal of Pharmaceutical Sciences. 96:1794-1801 (2007).
108. Brown W, Marques M. Question and answer section, Dissolution Technologies. 2003. http://www.dissolutiontech.com/DTresour/0203art/DTFeb03_Q_A.pdf.

Accessed 15 Nov 2017).

109. Z.M. Gao, T.; Doub, W.; Westenberger, L. and Buhse, L. Effects of Deaeration Methods on Dissolution Testing in Aqueous Media: A Study Using a Total Dissolved Gas Pressure Meter. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 95:1606-1613 (2006).
110. Azarmi S, Roa W, Löbenberg R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *Int J Pharm*. 2007;328(1):12–21(128).
111. D.M. Mudie, G.L. Amidon, and G.E. Amidon. Physiological parameters for oral delivery and *in vitro* testing. *Molecular pharmaceuticals*. 7:1388-1405 (2010).
112. L. Kalantzi, K. Goumas, V. Kalioras, B. Abrahamsson, J.B. Dressman, and C. Reppas. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical research*. 23:165-176 (2006).
113. Kalantzi, L.; Goumas, K.; Kalioras, V.; Abrahamsson, B.; Reppas, C. Characterization of the Human Upper Gastrointestinal Contents under Conditions Simulating Bioavailability/Bioequivalence Studies. *Pharm. Res*. 2006, 23, 165–176).
114. Clarysse, S.; Tack, J.; Lammert, F.; Duchateau, G.; Reppas, C.; Augustijns, P. Postprandial Evolution in Composition and Characteristics of Human Duodenal Fluids in Different Nutritional States. *J. Pharm. Sci*. 2009, 98, 1177–1192).
115. J.M. Sheng, D. and Amidon, G. Toward an *In Vivo* Dissolution Methodology: A Comparison of Phosphate and Bicarbonate Buffers. *Molecular Pharmaceuticals*. 6:29-39 (2008).
116. Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 38 NF 33, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD (2015) (126).
117. European Pharmacopoeia. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe (2007).
118. E. Jantratid and J. Dressman. Biorelevant Dissolution Media Simulating the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update. *Dissolution Technol*:21-25 (2009).

119. Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the *in vivo* dissolution of lipophilic compounds. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;60(3):413–7).
120. E. Jantratid, N. Janssen, C. Reppas, and J.B. Dressman. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharmaceutical research.* 25:1663-1676 (2008).
121. Fotaki N, Symillides M, Reppas C. *In vitro* versus canine data for predicting input profiles of isosorbide-5-monohydrate from oral extended release products on a confidence interval basis. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(1):115–22.
122. Chen L, Li X, Pang Y, Li L, Zhang X, Yu L. Resistant starch as a carrier for oral colon-targeting drug matrix system. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18(11):2199–203).
123. Zoeller, T and Klein, S. Simplified Biorelevant Media for Screening Dissolution Performance of Poorly Soluble Drugs. *Dissolution Technol:*8-13 (2007).
124. Taupitz, T. and Klein, S. Can Biorelevant Media be Simplified by using SLS and Tween 80 to Replace Bile Compounds? *The Open Drug Delivery Journal.* 4:30-37 (2010).
125. Fotaki N, Brown W, Kochling J, Chokshi H, Miao H, Tang K, et al. Rationale for selection of dissolution media: three case studies. *Dissolution Technol.* 2013;20(3):6–13).
126. D.P. McNamara, K.M. Whitney, and S.L. Goss. Use of a physiologic bicarbonate buffer system for dissolution characterization of ionizable drugs. *Pharmaceutical research.* 20:1641-1646 (2003).
127. G. Garbacz, B. Kolodziej, M. Koziol, W. Weitschies, and S. Klein. An automated system for monitoring and regulating the pH of bicarbonate buffers. *AAPS PharmSciTech.* 14:517-522 (2013).
128. Liu F, Merchant HA, Kulkarni RP, Alkademi M, Basit AW. Evolution of a physiological pH 6.8 bicarbonate buffer system: application to the dissolution testing of enteric coated products. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78(1):151–7).
129. Krieg BJ, Taghavi SM, Amidon GL, Amidon GE. *In vivo* predictive dissolution:

- comparing the effect of bicarbonate and phosphate buffer on the dissolution of weak acids and weak bases. J Pharm Sci. 2015;104(9):2894–904).
130. S. Hayes, A. Dunne, T. Smart, and J. Davis. Interpretation and optimization of the dissolution specifications for a modified release product with an *in vivo-in vitro* correlation (IVIVC). Journal of pharmaceutical sciences. 93:571-581 (2004).
 131. US FDA, US Departament of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of *In Vitro/In Vivo* Correlations, (1997).
 132. Patel R, Palmer JL, Joshi S, Dio Cío Gimena A, Esquivel F. Pharmacokinetic and Bioequivalence Studies of a Newly Developed Branded Generic of Candesartan Cilxetil Tablets in Healthy Volunteers. Clin Pharmacol Drug Dev. 2017 Sep;6(5):492-498. Epub 2016 Dec 22).
 133. Candesartán cilxetilo. Disponible en <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00796>. Consultado: 28-01-2017).
 134. Ficha técnica de Atacand AGEMED. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/61894/FT_61894.html#5-2-propiedades-farmacocin-ticas. Consultado: 28 de diciembre de 2017).
 135. Valsartan. Disponible en <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00177>. Consultado: 28-01-2017).
 136. Ficha técnica de Diovan AGEMED. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/64473/FT_64473.html Consultado: 29 de diciembre de 2017).
 137. Clonazepam. Disponible en <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01068>. Consultado: 28-01-2017).
 138. Ficha técnica de Rivotril AGEMED. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/52334/FT_52334.html#5-propiedades-farmacol-gicas Consultado: 29 de diciembre de 2017).
 139. Domenech Berrozpe J, Diez Martin I, Peraire Guitart C. Administración

- extravasal: aproximación compartimental. En: Domenech Berrozpe J, Martinez Lanao J, Peraire Guitart C. Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética - Volumen I: LADME. Análisis farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia. Madrid, España: Editorial Síntesis; 2015. p. 297-366.
140. Al-Gousous J, Langguth P. Oral Solid Dosage Form Disintegration Testing-The Forgotten Test. J Phar Sci. 104(9). 2015: 2664-75.
141. Fotaki N, Aivaliotis A, Butler J, Dressman J, Fischbach M, Hempenstall J, Klein S, Reppas C. A comparative study of different release apparatus in generating *in vitro-in vivo* correlations for extended release formulations. Eur J Pharm Biopharm. 73(1). 2009: 115-20.
142. F. Tugcu-Demiröz, I. Gonzalez-Alvarez, M. Gonzalez-Alvarez, and M. Bermejo. Validation of Phenol red Method for Water Reabsorption Process in Doluisio's Absorption Technique. Eur J Pharm Sci (2014).
143. Gurunath S, Nanjwade B, Patila P. Enhanced solubility and intestinal absorption of candesartan cilexetil solid dispersions using everted rat intestinal sacs. Saudi Pharm J. 2014. 22(3): 246-57.
144. Fuchs A, Leigh M, Kloefer B, Dressman JB. Advances in the design of fasted state simulating intestinal fluids: FaSSIF-V3. Eur J Pharm Biopharm. 94: 229-240 (2015).
145. Paus R, Prudic A, Ji Y. Influence of excipients on solubility and dissolution of pharmaceuticals. Int J Pharm. 485 (1-2): 277-87).
146. Aulton M. Farmacia: la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Elsevier España, S.A. Madrid, 2004).
147. Incecayir T. The effects of surfactants on the solubility and dissolution profiles of a poorly water-soluble basic drug, carvedilol. Pharmazie. 2015. 70 (12): 784-90.
148. Huang Z, Parikh S, Fish WP. Interactions between a poorly soluble cationic drug and sodium dodecyl sulfate in dissolution medium and their impact on *in vitro* dissolution behavior. Int J Pharm. 2018. 535 (1-2): 350-359.
149. Madelung P, Ostergaard J, Bertelsen P, Jorgensen EV, Jacobsen J, Müllertz A. Impact of sodium dodecyl sulphate on the dissolution of poorly soluble drug into

- biorelevant medium from drug-surfactant discs. *Int J Pharm.* 2014. 467 (1-2): 1-8.
150. Concentración Micelar Crítica. Disponible en <http://biomodel.uah.es/model2/lip/micelas-cmc.htm>. Consultado: 30-12-2018.
151. Ruiz A, Martínez-Martínez M, Colón-Useche S, Iriarte R, Sánchez-Dengra B, González-Álvarez M, García-Arieta A, González-Álvarez I y Bermejo M. *In Vitro* Dissolution as a Tool for Formulations Selection: Telmisartan Two-Step IVIVC. *Mol. Pharmaceutics.* 2018, 15, 2307-2315.
152. Vuletic L, Khan MZI, Spolkaric D, Radic M, Cetina-Cizmek B, Filipovic-Grcic J. Development of a Clinically Relevant Dissolution Method for Metaxalone Immediate Release Formulations Based on an IVIVC Model. *Pharm Res.* 2018. 35 (8):163.
153. Sánchez-Castaño G, Ruíz-García A, Bañón N, Bermejo M, Merino V, Freixas J, Garrigues TM, Plá-Delfina JM. Intrinsic absolute bioavailability prediction in rats based on in situ absorption rate constants and/or *in vitro* partition coefficients: 6-fluoroquinolones. *J Pharm Sci.* 2000, 89 (11): 1395-403.
154. Jain S, Reddy VA, Arora S, Patel K. Development of surface stabilized candesartan cilexetil nanocrystals with enhanced dissolution rate, permeation rate across CaCo-2, and oral bioavailability. *Drug Deliv Transl Res.* 2016. 5: 498-510.
155. Chella N and Tadikonda R. Melt dispersion granules: formulation and evaluation to improve oral delivery of poorly soluble drugs-a case study with valsartan. *Drug Dev Ind Pharm.* 41(6): 888-97. 2015.
156. Klein S. The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the *In Vivo* Performance of a Drug. *The AAPS Journal.* 12(3): 397-406. 2010.
157. García-Arieta A. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: impact on bioequivalence. *Eur J Pharm Sci.* 18;65: 89-97. 2014.
158. Hamed R. Physiological Parameters of the Gastrointestinal Fluid Impact the Dissolution Behavior of the BCS Class IIa Drug Valsartan. *Pharm Dev Technol.* 15.

2018: 1-31.

159. Beg S, Swain S, Pratap Singh H, Niranjana P Ch, Bhanoji Rao ME. Development, Optimization, and Characterization of Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems of Valsartan Using Porous Carriers. *AAPS PharmSciTech*. 2012. 13 (4): 1416-1427.
160. Shayesth TH, Radmehr M, Khajavi F, Mahjub R. Application of chemometrics in determination of the acid dissociation constants (pKa) of several benzodiazepine derivatives as poorly soluble drugs in the presence of ionic surfactants. *Eur J Pharm Sci*. 10;69: 44-50. 2015.
161. ChemSpider Clonazepam. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2700.html>. Consultado Noviembre, 09 2018.
162. Rowe R, Sheskey P and Quinn M. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association. USA. 2009.
163. R. ef and A. Narang. Impact of excipient interactions on drug bioavailability from solid dosage forms. *Pharmaceutical research*. 29:2639-2659 (2012).
164. Nour S, Abdelmalak N, Naguib M, Rashed H, Ibrahim A. Intranasal brain-targeted clonazepam polymeric micelles for immediate control of status epilepticus: *in vitro* optimization, *ex vivo* determination of cytotoxicity, *in vivo* biodistribution and pharmacodynamics studies. *Journal Drug Delivery*. 2016. 23 (9): 3681-3695.

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: SUBCLASIFICACIÓN DEL SCB SEGÚN SOLUBILIDAD A PH 2 Y PH 6,5 DE FÁRMACOS ÁCIDOS (A), FÁRMACOS BÁSICOS (B) Y NEUTROS (C) ⁽¹³⁾	18
TABLA 2: CARACTERÍSTICAS DE LOS FÁRMACOS Y PARÁMETROS FISIOLÓGICOS QUE DETERMINAN LA DISOLUCIÓN DE FÁRMACOS ADMINISTRADOS Y SU ABSORCIÓN ⁽⁹⁹⁾	39
TABLA 3: PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS EN LOS DIFERENTES TRAMOS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL EN AYUNO Y POSTERIOR A LA INGESTA DE ALIMENTOS ⁽⁹⁹⁾	47
TABLA 4: COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS ESTABLECIDOS EN LAS FARMACOPÉAS A LOS PH REPRESENTATIVOS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.	48
TABLA 5: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DE LOS MEDIOS FASSGF, FESSGF INICIAL, FESSGF MEDIA Y FESSGF TARDÍA ⁽¹²⁰⁾	50
TABLA 6: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DE LOS MEDIOS FASSIF, FASSIF-V2, FESSIF INICIAL, FESSIF MEDIA, FESSIF TARDÍA Y FESSIF-V2 ^{(100) (122)}	52
TABLA 7: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DE LOS MEDIOS SCoF1 (FLUIDO SIMULADO DE COLON) Y SCoF2 (FLUIDO SIMULADO DE COLON 2)	53
TABLA 8: POSIBILIDAD DE DESARROLLAR UNA CORRELACIÓN EN FUNCIÓN DE LA CLASIFICACIÓN EN EL SCB DE FÁRMACOS.....	56
TABLA 9: MEDIOS ENSAYADOS EN LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN.....	69
TABLA 10: PESADAS DE PRINCIPIOS ACTIVOS Y CONCENTRACIONES DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO USADAS EN EL ENSAYO DE PERMEABILIDAD EN ANIMALES	72
TABLA 11: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LINEALIDAD	80
TABLA 12: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA EXACTITUD	81
TABLA 13: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA PRECISIÓN	82
TABLA 14: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA ESTABILIDAD	82
TABLA 15: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA INFLUENCIA DE FILTRO	83
TABLA 16: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LINEALIDAD Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA CANDESARTÁN CILEXETILO.....	90
TABLA 17: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EXACTITUD Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA CANDESARTÁN CILEXETILO.....	91
TABLA 18: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD PARA CANDESARTÁN CILEXETILO	91
TABLA 19: RESUMEN DE PARÁMETROS Y COMPARACIÓN DE VARIANZAS PARA LA APLICACIÓN DEL TEST DE COMPARACIÓN DE MEDIAS EN EL ANÁLISIS DE PRECISIÓN INTERMEDIA PARA CANDESARTÁN CILEXETILO	92
TABLA 20: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ESTABILIDAD PARA CANDESARTÁN CILEXETILO	92
TABLA 21: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ROBUSTEZ PARA CANDESARTÁN CILEXETILO	93

TABLA 22: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A LOS DISTINTOS PH ESTUDIADOS	94
TABLA 23: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN MEDIOS BIOPREDICTIVOS	95
TABLA 24: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES.....	96
TABLA 25: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, A Y B)	97
TABLA 26: RESULTADO DE LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE MÚLTIPLE DE SCHEFFE DE LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, A Y B)	97
TABLA 27: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE CANDESARTÁN CILEXETILO.....	98
TABLA 28: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, A Y B).....	99
TABLA 29: RESULTADO DE LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE SCHEFFE DE LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, A Y B).....	99
TABLA 30: TIEMPO DE DISGREGACIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE CANDESARTÁN CILEXETILO	100
TABLA 31: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 1,2 DE CLORURO DE SODIO 50 MM EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	101
TABLA 32: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 4,5 DE ACETATO DE SODIO 36,5 MM EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6).....	102
TABLA 33: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6).....	103
TABLA 34: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 10 MM EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6).....	104
TABLA 35: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 0,1% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6).....	105
TABLA 36: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 1% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	106
TABLA 37: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,30% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	107
TABLA 38: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,20% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	108
TABLA 39: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,15% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	109
TABLA 40: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,10% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	110
TABLA 41: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO FASSIF EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6).....	111
TABLA 42: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO PH 1,2 50 MM + PH 4,5 36,5 MM + PH 6,8 50 MM TODOS CON TWEEN 20 0,20 % EMPLEANDO APARATO IV A 8 ML/MIN (N=6)	113
TABLA 43: PORCENTAJES DISUELTOS DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN FASSGF+FASSIF, EMPLEANDO APARATO IV A 8 ML/MIN (N=6)	114
TABLA 44: FACTOR DE SIMILITUD F ₂ ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN APARATO II A 50 R.P.M.	115
TABLA 45: FACTOR DE SIMILITUD F ₂ ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN APARATO IV A 8 ML/MIN.....	115
TABLA 46: CONCENTRACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO REMANENTE (μG/ML) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A UNA CONCENTRACIÓN DE 64 μG/ML PREPARADA A PARTIR DEL PRODUCTO DE REFERENCIA	116
TABLA 47: CONCENTRACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO REMANENTE (μG/ML) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A UNA CONCENTRACIÓN DE 64 μG/ML PREPARADA A PARTIR DEL PRODUCTO A.....	117

TABLA 48: CONCENTRACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A UNA CONCENTRACIÓN DE $64 \mu\text{G}/\text{ML}$ PREPARADA A PARTIR DEL PRODUCTO B.....	117
TABLA 49: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO CANDESARTÁN CILEXETILO.....	118
TABLA 50: RESULTADO DE LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE CANDESARTÁN CILEXETILO (REFERENCIA, A Y B).....	118
TABLA 51: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE CANDESARTÁN CILEXETILO Y LAS FORMULACIONES REFERENCIA, A Y B.....	119
TABLA 52: RESULTADO DE LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE CANDESARTÁN CILEXETILO Y LAS FORMULACIONES REFERENCIA, A Y B	119
TABLA 53: CONCENTRACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A UNA CONCENTRACIÓN DE $64 \mu\text{G}/\text{ML}$	120
TABLA 54: CONCENTRACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A UNA CONCENTRACIÓN DE $64 \mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE LACTOSA A CONCENTRACIÓN DE $0,22 \text{ MG}/\text{ML}$	121
TABLA 55: CONCENTRACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDOS TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A UNA CONCENTRACIÓN DE $64 \mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE LACTOSA A CONCENTRACIÓN DE $0,64 \text{ MG}/\text{ML}$	121
TABLA 56: CONCENTRACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A UNA CONCENTRACIÓN DE $64 \mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE MACROGOL A CONCENTRACIÓN DE $0,008 \text{ MG}/\text{ML}$	122
TABLA 57: CONCENTRACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A UNA CONCENTRACIÓN DE $64 \mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE HIDROXIPROPILCELULOSA A CONCENTRACIÓN DE $0,013 \text{ MG}/\text{ML}$	122
TABLA 58: CONCENTRACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A UNA CONCENTRACIÓN DE $64 \mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE ALMIDÓN A CONCENTRACIÓN DE $0,064 \text{ MG}/\text{ML}$	123
TABLA 59: CONCENTRACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A UNA CONCENTRACIÓN DE $64 \mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE ESTEARATO DE MAGNESIO A CONCENTRACIÓN DE $0,0042 \text{ MG}/\text{ML}$	123
TABLA 60: CONCENTRACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO A UNA CONCENTRACIÓN DE $64 \mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE TALCO A CONCENTRACIÓN DE $0,0032 \text{ MG}/\text{ML}$	124
TABLA 61: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE CANDESARTÁN CILEXETILO Y LOS EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO	125
TABLA 62: RESULTADO DE LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN DISOLUCIÓN SÓLO Y EN PRESENCIA DE LOS EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO	125
TABLA 63: CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (C_p -T) DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA IN VIVO	126
TABLA 64: PERFILES F_A -T DEL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA IN VIVO OBTENIDOS CON EL MODELO DE LOO-RIEGELMAN PARA CANDESARTÁN CILEXETILO.....	127
TABLA 65: PERFILES F_{DISS} -T DE CANDESARTÁN CILEXETILO DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN IN VITRO EN LOS MEDIOS $\text{PH } 1,2 \text{ 50 MM} + \text{PH } 4,5 \text{ 36,5 MM} + \text{PH } 6,8 \text{ 50 MM}$ TODOS CON TWEEN 20 $0,20\%$ EMPLEANDO EL APARATO IV, TRAS EL ESCALADO EN MAGNITUD	128
TABLA 66: ECUACIONES DE AJUSTADO DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO PARA LAS FORMULACIONES ESTUDIADAS SEGÚN LA ECUACIÓN DE WEIBULL	131
TABLA 67: PERFILES DE C_p -T DE CANDESARTAN CILEXETILO PREDICHOS A PARTIR DE LA CIVIV PARA LAS TRES FORMULACIONES ESTUDIADAS.....	135
TABLA 68: VALIDACIÓN INTERNA DE LA CIVIV	137

TABLA 69: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LINEALIDAD Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA VALSARTÁN.....	138
TABLA 70: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EXACTITUD Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA VALSARTÁN.....	139
TABLA 71: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD PARA VALSARTÁN	139
TABLA 72: RESUMEN DE PARÁMETROS Y COMPARACIÓN DE VARIANZAS PARA LA APLICACIÓN DEL TEST DE COMPARACIÓN DE MEDIAS EN EL ANÁLISIS DE PRECISIÓN INTERMEDIA.....	140
TABLA 73: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ESTABILIDAD PARA VALSARTÁN	140
TABLA 74: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ROBUSTEZ PARA VALSARTÁN	141
TABLA 75: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE VALSARTÁN A LOS DISTINTOS PH ESTUDIADOS	142
TABLA 76: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE VALSARTÁN EN MEDIOS BIOPREDICTIVOS	143
TABLA 77: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE VALSARTÁN EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES	144
TABLA 78: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE VALSARTÁN EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO.....	144
TABLA 79: RESULTADO DE LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE SCHEFFE DE LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE VALSARTÁN EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO	145
TABLA 80: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE VALSARTÁN.....	146
TABLA 81: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE VALSARTÁN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, C Y D).....	147
TABLA 82: RESULTADO DE LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE SCHEFFE DE LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE VALSARTÁN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, C Y D)	147
TABLA 83: TIEMPO DE DISGREGACIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE VALSARTÁN	147
TABLA 84: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 1,2 DE CLORURO DE SODIO 50 MM EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6).....	148
TABLA 85: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 4,5 DE ACETATO DE SODIO 36,5 MM EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6).....	149
TABLA 86: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM, EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	150
TABLA 87: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 10 MM EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	151
TABLA 88: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 0,1% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	152
TABLA 89: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 1% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	153
TABLA 90: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,30% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	154
TABLA 91: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,20% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	155
TABLA 92: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,15% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	156
TABLA 93: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,10% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	157
TABLA 94: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO FASSIF EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6).....	158
TABLA 95: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO PH 1,2 50 MM + PH 4,5 36,5 MM + PH 6,8 50 MM TODOS CON TWEEN 20 0,20 %, EMPLEANDO APARATO IV A 8 ML/MIN (N=6)	160
TABLA 96: PORCENTAJES DISUELTOS DE VALSARTÁN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN FASSGF+FASSIF, EMPLEANDO APARATO IV A 8 ML/MIN (N=6)	161
TABLA 97: FACTOR DE SIMILITUD F ₂ ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO C Y D DE VALSARTÁN EN APARATO II A 50 R.P.M. (N/A: NO APLICA)	162
TABLA 98: FACTOR DE SIMILITUD F ₂ ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO C Y D DE VALSARTÁN EN APARATO IV A 8 ML/MIN.....	162

TABLA 99: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ PREPARADA A PARTIR DEL PRODUCTO DE REFERENCIA.....	163
TABLA 100: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ PREPARADA A PARTIR DEL PRODUCTO C	164
TABLA 101: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ PREPARADA A PARTIR DEL PRODUCTO D.....	164
TABLA 102: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO VALSARTÁN (REFERENCIA, C Y D)	165
TABLA 103: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE VALSARTÁN Y LAS FORMULACIONES REFERENCIA, C Y D.....	166
TABLA 104: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$	167
TABLA 105: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ EN PRESENCIA DE CROSPVIDONA A CONCENTRACIÓN DE $0,32 \text{ mg}/\text{mL}$	168
TABLA 106: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ EN PRESENCIA DE ESTEARATO DE MAGNESIO A CONCENTRACIÓN DE $0,072 \text{ mg}/\text{mL}$	168
TABLA 107: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ EN PRESENCIA DE CELULOSA MICROCRISTALINA A CONCENTRACIÓN DE $0,60 \text{ mg}/\text{mL}$	169
TABLA 108: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ EN PRESENCIA DE MACROGOL A CONCENTRACIÓN DE $0,006 \text{ mg}/\text{mL}$	169
TABLA 109: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ EN PRESENCIA DE HIDROXIMETILCELULOSA A CONCENTRACIÓN DE $0,06 \text{ mg}/\text{mL}$	170
TABLA 110: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ EN PRESENCIA DE TALCO A CONCENTRACIÓN DE $0,006 \text{ mg}/\text{mL}$	170
TABLA 111: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ EN PRESENCIA DE DÍOXIDO DE TITANIO A CONCENTRACIÓN DE $0,009 \text{ mg}/\text{mL}$	171
TABLA 112: CONCENTRACIÓN DE VALSARTÁN REMANENTE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE VALSARTÁN A UNA CONCENTRACIÓN DE $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ EN PRESENCIA DE SILICIO A CONCENTRACIÓN DE $0,024 \text{ mg}/\text{mL}$	171
TABLA 113: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTE A LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE VALSARTÁN Y LOS EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO.....	172
TABLA 114: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE LINEALIDAD Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA CLONAZEPAM	173
TABLA 115: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EXACTITUD Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA CLONAZEPAM	174
TABLA 116: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD PARA CLONAZEPAM	175
TABLA 117: RESUMEN DE PARÁMETROS Y COMPARACIÓN DE VARIANZAS PARA LA APLICACIÓN DEL TEST DE COMPARACIÓN DE MEDIAS EN EL ANÁLISIS DE PRECISIÓN INTERMEDIA PARA CLONAZEPAM	175
TABLA 118: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ESTABILIDAD PARA CLONAZEPAM	176
TABLA 119: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ROBUSTEZ PARA CLONAZEPAM.....	176
TABLA 120: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CLONAZEPAM A LOS DISTINTOS pH ESTUDIADOS.....	177
TABLA 121: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CLONAZEPAM EN MEDIOS BIOPREDICTIVOS	178
TABLA 122: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CLONAZEPAM EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES	179

TABLA 123: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CLONAZEPAM EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, E Y F) .	180
TABLA 124: RESULTADO DE LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE SCHEFFE DE LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CLONAZEPAM EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, E Y F)	180
TABLA 125: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE CLONAZEPAM	181
TABLA 126: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CLONAZEPAM DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, E Y F).....	182
TABLA 127: RESULTADO DE LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE SCHEFFE DE LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CLONAZEPAM DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, E Y F).....	182
TABLA 128: TIEMPO DE DISGREGACIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE CLONAZEPAM	182
TABLA 129: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 1,2 DE CLORURO DE SODIO 50 MM EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6).....	183
TABLA 130: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 4,5 DE ACETATO DE SODIO 36,5 MM EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6).....	184
TABLA 131: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM, EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	185
TABLA 132: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 10 MM EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	186
TABLA 133: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 0,1% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	187
TABLA 134: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 1%, EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	188
TABLA 135: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,30%, EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	189
TABLA 136: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,20%, EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	190
TABLA 137: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,15%, EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	191
TABLA 138: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,10% EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6)	192
TABLA 139: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO FASSIF, EMPLEANDO APARATO II A 50 R.P.M. (N=6).....	193
TABLA 140: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN MEDIO PH 1,2 50 MM + PH 4,5 36,5 MM + PH 6,8 50 MM TODOS CON TWEEN 20 0,20 %, EMPLEANDO APARATO IV A 8 ML/MIN (N=6)	194
TABLA 141: PORCENTAJES DISUELTOS DE CLONAZEPAM EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN FASSGF+FASSIF, EMPLEANDO APARATO IV A 8 ML/MIN (N=6).....	196
TABLA 142: FACTOR DE SIMILITUD F_2 ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO E Y F DE CLONAZEPAM EN APARATO II A 50 R.P.M. (N/A: NO APLICA)	197
TABLA 143: FACTOR DE SIMILITUD F_2 ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO E Y F DE CLONAZEPAM EN APARATO IV A 8 ML/MIN	197
TABLA 144: CONCENTRACIÓN DE CLONAZEPAM REMANENTE ($\mu\text{G/ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CLONAZEPAM A UNA CONCENTRACIÓN DE 4 $\mu\text{G/ML}$ PREPARADA A PARTIR DEL PRODUCTO DE REFERENCIA.....	198
TABLA 145: CONCENTRACIÓN DE CLONAZEPAM REMANENTE ($\mu\text{G/ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CLONAZEPAM A UNA CONCENTRACIÓN DE 4 $\mu\text{G/ML}$ PREPARADA A PARTIR DEL PRODUCTO E	199
TABLA 146: CONCENTRACIÓN DE CLONAZEPAM REMANENTE ($\mu\text{G/ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CLONAZEPAM A UNA CONCENTRACIÓN DE 4 $\mu\text{G/ML}$ PREPARADA A PARTIR DEL PRODUCTO F	199
TABLA 147: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE CLONAZEPAM (REFERENCIA, E Y F).....	200

TABLA 148: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE CLONAZEPAM Y LAS FORMULACIONES REFERENCIA, E Y F.....	201
TABLA 149: CONCENTRACIÓN DE CLONAZEPAM REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CLONAZEPAM A UNA CONCENTRACIÓN DE 4 $\mu\text{G}/\text{ML}$	201
TABLA 150: CONCENTRACIÓN DE CLONAZEPAM REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CLONAZEPAM A UNA CONCENTRACIÓN DE 4 $\mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE LACTOSA A CONCENTRACIÓN DE 0,68 MG/ML	202
TABLA 151: CONCENTRACIÓN DE CLONAZEPAM REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CLONAZEPAM A UNA CONCENTRACIÓN DE 4 $\mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE ALMIDÓN A CONCENTRACIÓN DE 0,08 MG/ML	202
TABLA 152: CONCENTRACIÓN DE CLONAZEPAM REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CLONAZEPAM A UNA CONCENTRACIÓN DE 4 $\mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE ESTEARATO DE MAGNESIO A CONCENTRACIÓN DE 0,006 MG/ML	203
TABLA 153: CONCENTRACIÓN DE CLONAZEPAM REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CLONAZEPAM A UNA CONCENTRACIÓN DE 4 $\mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE TALCO A CONCENTRACIÓN DE 0,008 MG/ML	203
TABLA 154: CONCENTRACIÓN DE CLONAZEPAM REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CLONAZEPAM A UNA CONCENTRACIÓN DE 4 $\mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE POVIDONA A CONCENTRACIÓN DE 0,02 MG/ML	204
TABLA 155: CONCENTRACIÓN DE CLONAZEPAM REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CLONAZEPAM A UNA CONCENTRACIÓN DE 4 $\mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE CELULOSA MICROCRISTALINA A CONCENTRACIÓN DE 0,23 MG/ML.....	205
TABLA 156: CONCENTRACIÓN DE CLONAZEPAM REMANENTE ($\mu\text{G}/\text{ML}$) EN EL LUMEN INTESTINAL A DISTINTOS TIEMPOS DE MUESTREO, OBTENIDA TRAS LA PERFUSIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE CLONAZEPAM A UNA CONCENTRACIÓN DE 4 $\mu\text{G}/\text{ML}$ EN PRESENCIA DE CELULOSA MICROCRISTALINA A CONCENTRACIÓN DE 0,10 MG/ML.....	205
TABLA 157: PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS Y ANOVA DE UN FACTOR CORRESPONDIENTES A LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE CLONAZEPAM Y LOS EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, E Y F)	206
TABLA 158: RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA IN VIVO DE LAS FORMULACIONES DE CANDESARTÁN CILEXETILO	209
TABLA 159: DATOS DE LOS ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA IN VIVO DE LAS FORMULACIONES DE VALSARTÁN	209
TABLA 160: DATOS DE LOS ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA IN VIVO DE LAS FORMULACIONES DE CLONAZEPAM	210

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CLASIFICACIÓN DE LOS FÁRMACOS SEGÚN EL SCB	16
FIGURA 2: SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA DE EXCIPIENTES. ADAPTADA DE ⁽⁹⁴⁾	36
FIGURA 3: ESTRUCTURA DE CANDESARTÁN CILEXETILO	58
FIGURA 4: ESTRUCTURA DE VALSARTÁN	59
FIGURA 5: ESTRUCTURA DE CLONAZEPAM	61
FIGURA 6: ESQUEMA DE LAS TRES POSICIONES DE LA LLAVE DE TRES PASOS DE TIPO STOPCOCK	74
FIGURA 7: MODELO PARA DETERMINAR LA CONSTANTE APARENTE DE ABSORCIÓN. COMPARTIMIENTO C: . LUGAR DONDE SE PRODUCE LA ABSORCIÓN (INTESTINO). COMPARTIMIENTO D; ORGANISMO	76

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1: CURVA DE CALIBRACIÓN CANDESARTÁN CILEXETILO, LINEALIDAD	91
GRÁFICA 2: PERFIL DE CONCENTRACIONES A SATURACIÓN EN FUNCIÓN DEL PH DE CANDESARTÁN CILEXETILO A 37°C	94
GRÁFICA 3: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES.....	97
GRÁFICA 4: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE CANDESARTÁN CILEXETILO	99
GRÁFICA 5: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN TAMPÓN PH 1,2 DE CLORURO DE SODIO 50 MM (N=6) (CLORURO)	101
GRÁFICA 6: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN TAMPÓN PH 4,5 DE ACETATO DE SODIO 36,5 MM (N=6)	102
GRÁFICA 7: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM (N=6)	103
GRÁFICA 8: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 10 MM (N=6)	104
GRÁFICA 9: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 0,1% (N=6)	105
GRÁFICA 10: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 1% (N=6)....	106
GRÁFICA 11: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON	107
GRÁFICA 12: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,20% (N=6).....	108
GRÁFICA 13: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,15% (N=6).....	109
GRÁFICA 14: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,10% (N=6).....	110
GRÁFICA 15: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN MEDIO FASSIF (N=6)	111
GRÁFICA 16: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN MEDIO PH 1,2 50 MM + PH 4,5 36,5 MM + PH 6,8 50 MM TODOS CON	113
GRÁFICA 17: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES A Y B DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN MEDIO FASSGF+FASSIF (N=6)	114
GRÁFICA 18: REPRESENTACIÓN GRÁFICA COMPARATIVA DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO CANDESARTÁN CILEXETILO (REFERENCIA, A Y B).....	118
GRÁFICA 19: COMPARACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE CANDESARTÁN CILEXETILO Y LAS FORMULACIONES REFERENCIA, A Y B	119
GRÁFICA 20: REPRESENTACIÓN GRÁFICA COMPARATIVA DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN DE CANDESARTÁN CILEXETILO Y LOS EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO	124
GRÁFICA 21: PEFILES DE Cp-T DE CANDESARTÁN CILEXETILO DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, A Y B)	126
GRÁFICA 22: PEFILES DE FA-T DE LAS FORMULACIONES DE CANDESARTÁN CILEXETILO EN ESTUDIO (REFERENCIA, A Y B) OBTENIDAS POR EL MODELO DE LOO-RIEGELMAN.....	127
GRÁFICA 23: PEFILES F _{DIS} -T ESCALADOS EN MAGNITUD DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, A Y B) OBTENIDOS EN LOS MEDIOS PH 1,2 50 MM + PH 4,5 36,5 MM + PH 6,8 50 MM TODOS CON TWEEN 20 0,20% EMPLEANDO EL APARATO IV.....	129
GRÁFICA 24: AJUSTADO DEL PERFIL DE DISOLUCIÓN IN VITRO PARA EL PRODUCTO DE REFERENCIA DE CANDESARTÁN CILEXETILO SEGÚN EL MODELO DE WEIBULL.....	130

GRÁFICA 25: AJUSTADO DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN IN VITRO PARA LA FORMULACIÓN A DE CANDESARTÁN CILEXETILO SEGÚN EL MODELO DE WEIBULL	130
GRÁFICA 26: AJUSTADO DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN IN VITRO PARA LA FORMULACIÓN B DE CANDESARTÁN CILEXETILO SEGÚN EL MODELO DE WEIBULL	131
GRÁFICA 27: PERFILES F_A-T Y $F_{DIS}-T$ DE LAS FORMULACIONES ENSAYADAS DE CANDESARTÁN CILEXETILO SIN ESCALADO DE TIEMPO (HASTA $T=10$ H)	132
GRÁFICA 28: LEVY PLOT O ESCALADO DE TIEMPO	132
GRÁFICA 29: PERFILES F_A-T Y $F_{DIS}-T$ DE LAS FORMULACIONES ENSAYADAS DE CANDESARTÁN CILEXETILO CON EL TIEMPO ESCALADO (HASTA $T=10$ H)	133
GRÁFICA 30: CORRELACIÓN IN VIVO-IN VITRO	134
GRÁFICA 31: COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE C_p-T DE CANDESARTÁN CILEXETILO EXPERIMENTALES Y PREDICHOS POR LA CIVIV PARA EL PRODUCTO REFERENCIA	135
GRÁFICA 32: COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE C_p-T DE CANDESARTÁN CILEXETILO EXPERIMENTALES Y PREDICHOS POR LA CIVIV PARA LA FORMULACIÓN A.....	136
GRÁFICA 33: COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE C_p-T DE CANDESARTÁN CILEXETILO EXPERIMENTALES Y PREDICHOS POR LA CIVIV PARA LA FORMULACIÓN B.....	136
GRÁFICA 34: CURVA DE CALIBRACIÓN VALSARTÁN, LINEALIDAD	139
GRÁFICA 35: PERFIL EN FUNCIÓN DEL PH DE VALSARTÁN A 37°C.....	142
GRÁFICA 36: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE VALSARTÁN EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES.....	144
GRÁFICA 37: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE VALSARTÁN.....	146
GRÁFICA 38: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO TAMPÓN PH 1,2 DE CLORURO DE SODIO 50 MM (N=6).....	148
GRÁFICA 39: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN A PH 4,5 EN MEDIO TAMPÓN PH 4,5 DE ACETATO DE SODIO 36,5 MM (N=6)	149
GRÁFICA 40: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM (N=6).....	150
GRÁFICA 41: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 10 MM (N=6).....	151
GRÁFICA 42: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 0,1% (N=6).....	152
GRÁFICA 43: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 1% (N=6).....	153
GRÁFICA 44: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,30% (N=6).....	154
GRÁFICA 45: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE OSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,20% (N=6).....	155
GRÁFICA 46: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,15% (N=6)	156
GRÁFICA 47: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,10% (N=6)	157
GRÁFICA 48: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO FASSIF (N=6).....	158
GRÁFICA 49: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO PH 1,2 50 MM + PH 4,5 36,5 MM + PH 6,8 50 MM TODOS CON TWEEN 20 0,20 % (N=6)...	160
GRÁFICA 50: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES C Y D DE VALSARTÁN EN MEDIO FASSGF+FASSIF (N=6)	161
GRÁFICA 51: REPRESENTACIÓN GRÁFICA COMPARATIVA DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO VALSARTÁN (REFERENCIA, C Y D)	165
GRÁFICA 52: COMPARACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE VALSARTÁN Y LAS FORMULACIONES REFERENCIA, C Y D.....	165
GRÁFICA 53: REPRESENTACIÓN GRÁFICA COMPARATIVA DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN DE VALSARTÁN Y LOS EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, C Y D)	172

GRÁFICA 54: CURVA DE CALIBRACIÓN CLONAZEPAM, LINEALIDAD	174
GRÁFICA 55: PERFIL DE SOLUBILIDAD EN FUNCIÓN DEL PH DE CLONAZEPAM A 37°C	177
GRÁFICA 56: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE CLONAZEPAM EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES.....	180
GRÁFICA 57: CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE CLONAZEPAM	181
GRÁFICA 58: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO TAMPÓN PH 1,2 DE CLORURO DE SODIO 50 MM (N=6).....	183
GRÁFICA 59: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO TAMPÓN PH 4,5 DE ACETATO DE SODIO 36,5 MM (N=6).....	184
GRÁFICA 60: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM (N=6)	185
GRÁFICA 61: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO TAMPÓN PH 6,8 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 10 MM (N=6)	186
GRÁFICA 62: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 0,1% (N=6).....	187
GRÁFICA 63: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON LSS 1% (N=6)	188
GRÁFICA 64: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,30% (N=6)	189
GRÁFICA 65: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,20% (N=6).....	190
GRÁFICA 66: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,15% (N=6)	191
GRÁFICA 67: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO TAMPÓN PH 6,5 DE FOSFATO DIÁCIDO DE POTASIO 50 MM CON TWEEN 20 0,10% (N=6) ..	192
GRÁFICA 68: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO FASSIF (N=6)	193
GRÁFICA 69: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO PH 1,2 50 MM + PH 4,5 36,5 MM + PH 6,8 50 MM TODOS CON TWEEN 20 0,20 % (N=6) 195	195
GRÁFICA 70: PERFIL DE DISOLUCIÓN COMPARATIVO ENTRE EL PRODUCTO DE REFERENCIA Y LAS FORMULACIONES E Y F DE CLONAZEPAM EN MEDIO FASSGF+FASSIF (N=6)	196
GRÁFICA 71: REPRESENTACIÓN GRÁFICA COMPARATIVA DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO DE CLONAZEPAM (REFERENCIA, E Y F).....	200
GRÁFICA 72: COMPARACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN EN EL MODELO IN SITU DE CLONAZEPAM Y LAS FORMULACIONES REFERENCIA, E Y F	200
GRÁFICA 73: REPRESENTACIÓN GRÁFICA COMPARATIVA DE LAS CONSTANTES DE ABSORCIÓN DE CLONAZEPAM Y LOS EXCIPIENTES DE LAS FORMULACIONES EN ESTUDIO (REFERENCIA, E Y F).....	206